



Mise en évidence du système de communication "Quorum Sensing" impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée

Armande Mireille Aye

► To cite this version:

Armande Mireille Aye. Mise en évidence du système de communication "Quorum Sensing" impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Toulon, 2015. Français. NNT : 2015TOUL0002 . tel-01233256

HAL Id: tel-01233256

<https://theses.hal.science/tel-01233256>

Submitted on 1 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par Armande Mireille AYÉ

Soutenue le 20 Mars 2015

pour obtenir le grade de Docteur en

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Microbiologie / Biochimie

MISE EN EVIDENCE DU SYSTEME DE COMMUNICATION QUORUM SENSING IMPLIQUANT LES AHLs CHEZ DES BACTÉRIES MARINES ISOLÉES DE LA MÉDITERRANÉE

THÈSE dirigée par :

Pr Yves BLACHE

Co-encadrée par :

Pr Maëlle MOLMERET

MEMBRES DU JURY :

M. Gaël LE PENNEC	Maître de Conférences, Université de Bretagne-Sud	Rapporteur
M. Denis FAURE	Directeur de Recherche CNRS, ISV	Rapporteur
M. Eric CHABRIERE	Professeur, Université d'Aix-Marseille	Examineur
Mme Maryse BONNIN-JUSSERAND	Maître de Conférences, Université du littoral Côte d'Opale	Examineur
Mme Rose A. KOFFI-NEVRY	Maître de Conférences, Université d'Abidjan	Co-directrice
Mme Maëlle MOLMERET	Professeure, Université de Toulon	Co-encadrant
M. Yves BLACHE	Professeur, Université de Toulon	Directeur de thèse

Dédicace

A la mémoire de ma très chère maman, Valentine Ayé

Remerciements

En premier, je tiens à remercier mon DIEU, auteur de ma vie, qui m'a donné la santé et le courage pour aller au bout de cette thèse.

Cette thèse n'aurait pas pu se faire sans la contribution à divers niveaux de certaines institutions et de personnes, à qui je tiens ici à traduire ma profonde reconnaissance.

Au Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'ambassade de France en Côte d'Ivoire, avec Mme Juliette N'TAPKE KABLAN, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse, en m'octroyant une bourse de recherche.

A Campus France Marseille pour le financement de cette thèse. Je tiens particulièrement à remercier Mme Bettina THOMONT et à Mr Oualid BOUKHÉNIFRA, qui ont été mes conseillers durant les trois années de thèse.

A la communauté d'agglomération Toulon Provence Méditerranée également pour le financement de cette thèse.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire MAPIEM de l'Université de Toulon, au sein duquel un travail scientifique, mais aussi des échanges amicaux ont été développés.

Je remercie en premier le Pr André MARGAILLAN, Directeur du laboratoire MAPIEM pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à adresser mes sincères et chaleureux remerciements, tachés de reconnaissance aux encadrants de ma thèse, le Pr Yves BLACHE et la Pr Maëlle MOLMERET. Yves, je vous dois ma thèse car en acceptant son encadrement depuis Abidjan, vous m'avez offert l'opportunité d'atteindre mon objectif. En plus, je voudrais vous dire merci d'avoir su réorienter ma thèse au moment opportun, d'avoir été disponible malgré votre emploi du temps très chargé, et de vous être montré intéressé par mon travail. Et toi Maëlle, bien qu'ayant pris ma thèse en cours, tu as été comme le grain de sel qui manquait à la préparation. Merci pour ta disponibilité, tes encouragements, ton acharnement au travail bien fait, qui m'ont été d'une grande aide dans la rédaction de mon article ainsi que dans la finalisation et la pertinence de ma thèse.

Je tiens à remercier profondément le Dr Gaël LE PENNEC (Maître de conférences à l'Université de Bretagne sud) et le Dr Denis FAURE (Directeur de recherche CNRS) pour avoir accepté d'être rapporteurs, et de juger ce travail. Merci également au Pr Éric CHABRIÈRE (Professeur à l'Université d'Aix-Marseille), au Pr Rose NEVERY (Maître de conférences à l'Université Nangui-Abrogoua d'Abidjan) et au Dr Maryse BONNIN-

JUSSE RAND (Maître de conférences à l'Université du littoral Côte d'Opale) pour m'avoir fait l'honneur d'être membres de mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également à l'endroit du Dr Nadia RABAH, qui a commencé l'encadrement de ma thèse et qui as su guider mes premiers pas dans le laboratoire. Merci également à Denis LINARES, avec qui j'ai appris à réaliser les premières expériences en laboratoire.

Merci à Maryse BONNIN-JUSSE RAND avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration pendant un an dans le laboratoire et pour son apport dans la rédaction de l'article.

Merci aux maîtres de conférences de l'axe 2 du laboratoire MAPIEM, particulièrement au Dr Gérard CULIOLI, pour sa grande aide dans les analyses chromatographiques et au Dr Annick ORTALO-MAGNE, pour la caractérisation de la violacéine.

Merci aux stagiaires qui ont travaillé sur le sujet de ma thèse : Maëlle, Mélanie, Audrey, Laure et Juliette.

Merci à tous les membres du laboratoire MAPIEM, en particulier à A Jean-Michel ROBERT et à Olivier BOTZACK, pour m'avoir formé en chromatographie gazeuse et en RMN bien que cela n'ait pas été concluant dans la suite de mes travaux. Merci à Brigitte GEDOUX pour les commandes de mes petites AHLs. Merci également aux membres du Team MAPIEM en particulier, Marlène, Dutduan, Laurie, Aurélie, Hong, Madeleine, Sofyane, Hy, Son, Ronald, Vitalys, Ahmad, Aurore, Richard, Mahmoud pour les excellents moments partagés.

Que dire des filles avec qui j'ai partagé le même bureau pendant trois ans : Ahlem, Florence, Cynthia et Perrine. En quittant ma famille, je ne pensais pas trouver une 'presque famille'. On a partagé des moments formidables, rigolé comme des folles. Je garderai toujours un très bon souvenir de vous.

Un grand merci à toi Brigitte Tanguy. Tu as été pour moi comme une mère, sache-le, grâce à toi la vie a été plus facile pour moi. J'aurai toujours une pensée pour toi.

Ma formation scientifique a commencé depuis l'Université Nangui-Abrogoua ex Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan/Côte d'Ivoire)

Mes remerciements vont particulièrement à l'endroit du Pr Rose NEVRY, mon encadrant scientifique depuis la maîtrise et le DEA, ainsi qu'à tous les enseignants chercheurs de l'UFRSTA, avec à leur tête le Pr Patrice KOVAME, Doyen de l'UFRSTA.

Je ne saurai terminer sans une pensée spéciale pour les membres de ma famille, qui malgré la distance, m'ont toujours apporté leur soutien.

Grand merci à toi papa chéri AYE KOVASSI, qui a cru en moi avant moi-même. Merci à mes frères et sœurs : Kevin, Janine, Estelle, Arnaud, Landry, Bertrand et Patrick, Maman aurait été fière de moi si elle était encore des notre. Je vous aime tous ♥ ♥ ♥.

Merci aux membres de ma famille, surtout à mes tatas Augustine, Mathilde Marcelline et Emilienne pour votre soutien et aux vos prières. Une maman perdue, quatre retrouvées ♥ ♥.

Enfin, à mes amis d'ici et d'ailleurs

Merci à mes copains d'Abidjan : Solomen, Serge-Thibaut, Marina, Yvonne et Chantal, qui comme moi ont effectué leur travaux de thèse ici en France. Merci pour votre soutien quotidien, courant ces trois années de thèse. Merci spécial à toi Arthur, souviens-toi du 'gningninbou' du 02 Décembre 2011, le jour où tout a commencé. Merci de m'avoir supporté et soutenu tout ce temps.

Merci également à Larissa, Mélissa, Prudence, Christian, Marie-Josée, David, Vladimir, Ydriss (Mes copains de Toulon). Vous m'avez apporté bien plus que de l'amitié. Dieu vous bénisse. Un Merci spécial à toi Michel BOURNE, pour tout le soutien que tu m'as apporté, à tous les niveaux que ce soit.

Productions scientifiques

Article soumis :

Armande Mireille Ayé, Maryse Bonnin-Jusserand, Florence Brian-Jaisson, Annick Ortalo-Magné, Gérald Culioli, Rose Koffi Nevry, Maëlle Molmeret and Yves Blache (2015) Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing AHLs in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology*

Communications orales

Ayé Armande Mireille, Molmeret Maëlle et Blache Yves. «Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous AHLs in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 « *Workshop Biofouling & antifouling IV*, 9^{èmes} Journées Scientifiques de l'Université de Toulon (France), Avril 2015.

Ayé Armande Mireille, Bonnin-Jusserand Maryse, Molmeret Maëlle et Blache Yves. «Régulation de la production de violacéine et de la formation de biofilm chez *Pseudoalteromonas ulvae* (TC14) par des AHLs exogènes» 5^{èmes} Journées de l'assemblée générale annuelle du GDR BioChiMar Lorient (France), Novembre 2013.

Ayé Armande Mireille, Bonnin-Jusserand Maryse, Molmeret Maëlle and Blache Yves «*ulvae* (TC14) isolated in Mediterranean Sea: Regulation by exogenous AHLs» Congrès international *BioMicroWorld V* Madrid (Espagne), Octobre 2013.

Communications par affiches

Ayé Armande Mireille; Rabah Nadia, Culioli Gérald and Blache Y. «Quorum Sensing in marine bacteria: Isolation and characterization of signaling molecules» Congrès international *Biofilms 5*, Paris (France), Décembre 2012.

Ayé Armande Mireille; Rabah Nadia, Culioli Gérald, Blache Yves «Caractérisation du système de communication *Quorum Sensing* de bactéries marines et design de composés antifouling biodégradables » 5^{ème} Edition des Graines d'Adhésion, La Garde (France), Juillet 2012.

Ayé Armande Mireille; Rabah Nadia, Culioli Gérald, Blache Yves «Caractérisation du système de communication *Quorum Sensing* de bactéries marines et design de composés antifouling biodégradables » *Workshop Biofouling & antifouling I*, 6^{èmes} Journées Scientifiques de l'Université de Toulon (France), Avril 2012.

Liste des sigles et abréviations

ACP	Acyl Carrier Protein
AHL	Acyl homosérine lactone
AF	Antifouling
ASW	Artificial Sea Water (Eau de mer artificielle)
BDMM	Bleu de diméthyle méthylène
BFRT	Biofilm Ring Test
BFI	Indice de formation de biofilm
CE50	Concentration effective d'inhibition à 50%
CCM	Chromatographie sur couche mince
CV	Cristal Violet
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DMF	Diméthylformamide
EPS	Substances polymériques Extracellulaires
ESI-MS	<i>Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry</i> (Spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation)
FRC	<i>Fouling Release Coating</i>
HLS	Homosérine lactones
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IF	Intensité de fluorescence
LB	Luria Bertani Broth
LC-MS	Chromatographie Liquide -Spectrométrie de Masse
MB/MA	Marine Broth/Marine Agar
MS	Spectrométrie de masse
SAM	S-Adénosylméthionine
OMI	Organisation Maritime internationale
PSM	Poste de sécurité microbiologique
QQ	<i>Quorum quenching</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
QSI	Inhibition du <i>quorum sensing</i>
Rpm	Révolution par minute
SPC	Peinture auto polissage
TBT	Tributylétain
VNSS/VNSSA	<i>Väitänen Nine Salt Solution/ Väitänen Nine Salt Solution Agar</i>

Abréviation des AHLs

C ₄ -HSL	<i>N</i> -butyryl- <i>L</i> -homoserine lactone
C ₆ -HSL	<i>N</i> -hexanoyl- <i>L</i> -homoserine lactone
C ₇ -HSL	<i>N</i> -heptanoyl- <i>L</i> -homoserine lactone
C ₈ -HSL	<i>N</i> -octanoyl- <i>L</i> -homoserine lactone
C ₁₀ -HSL	<i>N</i> -decanoyl- <i>L</i> -homoserine lactone
C ₁₂ -HSL	<i>N</i> -dodecanoyl- <i>L</i> -homoserine lactone
C ₁₄ -HSL	<i>N</i> -tetradecanoyl- <i>L</i> -homoserine lactone
3-oxo-C ₆ -HSL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)- <i>L</i> -homoserine lactone
3-oxo-C ₈ -HSL	<i>N</i> -(3-oxooctanoyl)- <i>L</i> -homoserine lactone
3-oxo-C ₁₂ -HSL	<i>N</i> -(3-oxododecanoyl)- <i>L</i> -homoserine lactone

Liste des illustrations – Figures

Figure 1 Formation du biofouling sur une surface immergée.	9
Figure 2 Micro et macroorganismes marins.	10
Figure 3 Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien.	11
Figure 4 Quelques images de conséquences du biofilm.	16
Figure 5 Photos de microplaques du BFRT.	20
Figure 6 Images Microscopiques de <i>P. aeruginosa</i> fixé sur un coupon en acier.	21
Figure 7 Exemple de bioluminescence symbiotique.	35
Figure 8 Mécanisme du QS chez <i>V. fischeri</i>	35
Figure 9 Structure générale d'une AHL.	36
Figure 10 Différentes structures d'AHLs	38
Figure 11 Schéma général de la biosynthèse d'AHL par une protéine homologue de LuxI. ..	41
Figure 12 Système QS chez <i>P. aeruginosa</i>	43
Figure 13 Schéma général de l'utilisation des biosenseurs.	47
Figure 14 QS chez <i>A. tumefaciens</i>	49
Figure 15 QS chez <i>C. violaceum</i>	50
Figure 16 Arbre phylogénétique des souches du genre <i>Pseudoalteromonas</i>	69
Figure 17 Structure chimique de la violacéine.	77
Figure 18 Biosynthèse de la violacéine.	78
Figure 19 Image du grattage de biofilm après culture en conditions sessiles	96
Figure 20 Représentation schématique du protocole d'extraction des AHLs	97
Figure 21 Stries en T croisées entre bactéries marines et biosenseurs sur gélose VNSS.	98
Figure 22 Technique de détection des AHLs à partir de deux géloses séparées.	99
Figure 23 Détection des AHLs par recouvrement de la plaque de CCM.	100
Figure 24 Détection des AHLs dans les extraits de bactéries marines par les biosenseurs. ..	101
Figure 25 Représentation schématique du swimming.	106
Figure 26 Représentation schématique du swarming.	107
Figure 27 Représentation schématique du twitching.	107
Figure 28 Représentation schématique du protocole d'extraction de la violacéine	109
Figure 29 Structure chimique de l'esculétine.	112
Figure 30 Représentation schématique du principe du test BFRT.	114
Figure 31 Courbes de croissance des bactéries marines TC.	122
Figure 32 Suivi du pH des cultures bactériennes.	124
Figure 33 Détection des AHLs chez les bactéries marines par la technique en 'strie T-'	126
Figure 34 Détection des AHLs des bactéries marines par la technique des géloses séparées.	128
Figure 35 Plaques chromatographiques après CCM.	130
Figure 36 Révélation des plaques CCM par les biosenseurs.	130
Figure 37 Détection des AHLs à partir des extraits totaux de bactéries marines.	131
Figure 38 Chromatogramme HPLC en mode ESI d'un mélange de sept AHLs standards. ..	133
Figure 39 Fragmentation de l'AHL pour l'obtention du fragment m/z 102.	135
Figure 40 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de TC8.	135
Figure 41 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de TC14.	136

Figure 42 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de TC15.	136
Figure 43 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de 4M6.	136
Figure 44 Spectre de masse de la molécule à t_R = 19 min.	138
Figure 45 Spectre de masse de la molécule à t_R = 19 min.	138
Figure 46 Chromatogramme et spectre de masse en mode +ESI du standard C ₁₂ -HSL.	139
Figure 47 Effet de la C ₁₂ -HSL exogène sur l'adhésion de TC15 en microplaque.	143
Figure 48 Tests de motilité de TC15 en présence de la C ₁₂ -HSL.	145
Figure 49 Images des tests de motilité de TC15 en présence de la C ₁₂ -HSL.	146
Figure 50 Cinétique de formation de biofilm de TC15 en présence de la C ₁₂ -HSL.	148
Figure 51 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion de TC8.	150
Figure 52 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion de TC14.	152
Figure 53 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion de 4M6.	154
Figure 54 Effet des AHLs exogènes sur la motilité de 4M6.	157
Figure 55 Effet de la concentration des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14.	185
Figure 56 Effet des AHLs exogènes à 50 μ M sur la motilité de TC14.	188
Figure 57 Images de l'effet des AHLs exogènes sur le swimming de TC14.	189
Figure 58 Effet des AHLs exogènes sur la masse de biofilm formé par TC14.	191
Figure 59 Cinétique de croissance de TC14 en présence d'AHLs exogènes.	193
Figure 60 Cinétique de la formation de biofilm en présence d'AHLs exogènes.	194
Figure 61 Images de l'effet de la 3-oxo-C ₆ -HSL sur la formation de biofilm de TC14.	196
Figure 62 Effet des extraits de bactéries marines sur la croissance de TC14.	204
Figure 63 Effet des extraits de bactéries marines sur la production de violacéine par TC14.	205
Figure 64 Essais d'inhibition du QS entre TC14 et les bactéries marines.	207
Figure 65 Effet de l'esculétine à différentes concentrations sur la croissance de TC14.	209
Figure 66 Effet de l'esculétine sur la production de violacéine de TC14.	210
Figure 67 Comparaison de l'effet inhibiteur de la 3-oxo-C ₆ -HSL et de l'esculétine.	211
Figure 68 Effet de compétition entre inhibiteurs et activateurs du QS chez TC14.	214
Figure 69 Effet de l'esculétine sur la mobilité de TC14.	216
Figure 70 Effet de l'esculétine sur la formation de biofilm de TC14.	217
Figure 71 Effet de l'esculétine sur l'adhésion de TC14.	219
Figure 72 Effet des molécules commerciales sur la croissance de 12472.	221
Figure 73 Effet des molécules commerciales sur le QS de 12472.	222
Figure 74 Effet des molécules commerciales sur la croissance de TC14.	223
Figure 75 Effet des molécules commerciales sur la production de violacéine de TC14.	224
Figure 76 Effet des analogues synthétiques sur la croissance de 12472.	226
Figure 77 Effet des analogues synthétiques sur le QS de 12472.	227
Figure 78 Effet des analogues synthétiques sur la croissance de TC14.	228
Figure 79 Effet des analogues synthétiques sur la production de violacéine de TC14.	229

Figures articles

Fig.1 Kinetic of growth and production of violacein of the TC14.....	172
Fig.2 Effect of exogenous AHLs tested at on production of violacein from TC14	175
Fig.3 Effect of extracts of biosensors on production of violacein by TC14	176
Fig.4 Comparison of the relative (%) quantity of violacein sequestered in biofilm compared to the one associated with un-attached planktonic bacteria in presence or in absence of exogenous AHLs	176
Fig. S1 LC-DAD/MS analysis of an ethanolic extract of TC14	170
Fig.S2 HPLC-DAD data of an ethanolic extract of <i>P. ulvae</i> TC14 UV-Vis. spectrum	171
Fig.S3 TC14 growth in VNSS supplemented with exogenous AHLs at 50 μ M	174

Liste des illustrations – Tableaux

Tableau 1 Historique de l'évolution des stratégies antifouling.....	24
Tableau 2 Les principaux avantages et inconvénients des systèmes AF passés et présents	28
Tableau 3 Quelques exemples de composés biomimétiques isolés d'organismes marins	32
Tableau 4 Phénotypes sous contrôle du QS chez les bactéries marines et pathogènes.....	45
Tableau 5 Caractéristiques des biosenseurs utilisés en induction du QS	52
Tableau 6 Différentes implication du QS dans la formation de biofilm chez les bactéries.	56
Tableau 7 Quelques Inhibiteurs naturels et mécanismes de perturbation du QS.	62
Tableau 8 Quelques inhibiteurs synthétiques du QS.....	65
Tableau 9 Affiliation taxonomique des bactéries marines de la Toulon Collection.	68
Tableau 10 Description de composés bioactifs chez des espèces du genre <i>Pseudoalteromonas</i>	71
Tableau 11 Description des souches marines utilisées dans cette étude.	85
Tableau 12 Données relatives aux biosenseurs utilisés dans cette étude	86
Tableau 13 Composition chimique du milieu VNSS	88
Tableau 14 Composition chimique du milieu MB.	89
Tableau 15 Composition chimique du <i>Sea Salt</i> (Sigma Aldrich)	90
Tableau 16 Composition chimique du LB	90
Tableau 17 Composition chimique du tampon PBS	91
Tableau 18 Données relatives aux molécules standards AHLs utilisées dans cette étude.....	93
Tableau 19 Données relatives aux molécules commerciales testées en anti-QS.	115
Tableau 20 Données relatives aux molécules synthétiques testées en anti-QS.....	116
Tableau 21 Croissance des différentes bactéries sur différents milieux de culture.....	124
Tableau 22 Temps de rétention et ions produits pour chaque standard après la LC-MS.....	134
Tableau 23 CE ₅₀ de l'inhibition d'adhésion de certaines AHLs exogènes	156
Tableau 24 Effet d'inhibition du QS des molécules commerciales chez 12472 et TC14.....	225
Tableau 25 Effet d'induction du QS des analogues synthétiques chez 12472 et TC14.....	230

Sommaire

Dédicace	I
Remerciements	III
Productions scientifiques.....	VII
Liste des sigles et abréviations	IX
Liste des illustrations –Figures.....	XI
Liste des illustrations –Tableaux.....	XV
Sommaire	XVII

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Etude bibliographique7

1. Biofilm/Biofouling	9
1.1. Origine et définition	9
1.2. Biofilm marin	10
1.3. Mécanisme de la formation du biofilm	11
1.3.1. Le conditionnement de la surface par le milieu	11
1.3.2. L'adhésion des bactéries	11
1.3.2.1. Adhésion réversible	12
1.3.2.2. Adhésion irréversible	12
1.3.3. Maturation du biofilm	13
1.3.4. Dispersion.....	13
1.4. Substance polymérique extracellulaire (EPS)	14
1.5. Développement des bactéries en biofilm.....	14
1.6. Conséquences de la formation du biofilm.....	15
1.6.1. Secteur biomédical	15
1.6.2. Domaine agro-industriel.....	16
1.6.3. Environnement marin	17
1.6.3.1. Incidences économiques	17
1.6.3.2. Incidences écologiques	17
1.7. Principales techniques d'analyses de biofilm sur surfaces abiotiques	18
1.7.1. Techniques de quantification en microplaques	18
1.7.1.1. Méthodes colorimétriques.....	19
1.7.1.2. Méthodes de fluorescence.....	19
1.7.1.3. Méthodes radioactives	19

1.7.1.4.	Méthodes magnétiques.....	20
1.7.2.	Méthodes microscopiques	20
2.	Antifouling	22
2.1.	Définition et principe.....	22
2.2.	Historique et régulation	22
2.2.1.	Historique du TBT	22
2.2.2.	Impact du TBT sur l'environnement marin.....	23
2.3.	Différentes stratégies AF.....	25
2.3.1.	Revêtements AF chimiquement actifs.....	25
2.3.1.1.	Revêtements à base de biocides	25
2.3.1.2.	Revêtements à base d'enzymes.....	26
2.3.2.	Revêtements non toxiques.....	26
2.3.2.1.	Conception de surfaces microtopographiques	26
2.3.2.2.	Fouling Release Coating (FRC).....	27
2.3.3.	Approches biomimétiques.....	29
2.3.3.1.	Activité AF des bactéries marines	29
2.3.3.2.	Activité AF des cyanobactéries.....	30
2.3.3.3.	Activité AF des macroalgues et des éponges.....	30
2.4.	Inhibition des biofilms marins par des inhibiteurs du <i>quorum sensing</i>	31
3.	<i>Quorum sensing</i>	33
3.1.	Origine et découverte	33
3.2.	Définition.....	33
3.3.	Notion d'autoinducteurs	33
3.4.	Mécanisme du QS chez les bactéries	34
3.4.1.	QS chez les bactéries Gram négatif.....	34
3.4.1.1.	Cas de <i>Vibrio fischeri</i>	34
3.4.1.2.	Cas général des bactéries Gram négatif	36
3.4.2.	QS chez les bactéries Gram positif	37
3.5.	Différents types de molécules inductrices du QS.....	37
3.5.1.	Acyl Homosérine Lactones (AHLs).....	38
3.5.2.	Peptides	39
3.5.3.	Autres signaux.....	40
3.6.	Les protéines de famille LuxI et LuxR.....	40

3.6.1.	Protéines de famille de type LuxI	40
3.6.2.	Protéines de la famille de type LuxR	42
3.7.	QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
3.8.	Bactéries biosenseurs	46
3.8.1.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
3.8.2.	<i>Chromobacterium violaceum</i>	49
3.8.3.	Techniques de mise en évidence de l'activité QS des biosenseurs	50
3.8.3.1.	Stries croisées.....	50
3.8.3.2.	Recouvrement de la plaque CCM	51
3.8.3.3.	Quantification de l'activité QS grâce à système rapporteur	51
4.	Rôle du QS dans la formation de biofilm.....	53
4.1.	Rôle du QS dans les différentes étapes du développement du biofilm	53
4.1.1.	Attachement	53
4.1.2.	Maturation	54
4.1.3.	Dispersion.....	54
4.2.	Exemple d'implication du QS dans la formation de biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	55
4.3.	Avantages du QS pour les bactéries en biofilm	55
5.	Inhibition du <i>quorum sensing</i>	57
5.1.	Inactivation des AHLs (i).....	57
5.1.1.	Inhibition des AHLs par d'autres AHLs	57
5.1.2.	Inhibition des AHLs par des molécules synthétiques	58
5.1.3.	Inhibition des AHLs par des produits naturels d'organismes marins	58
5.1.4.	Dégradation enzymatique des AHLs.....	59
5.1.4.1.	AHL-lactonases.....	59
5.1.4.2.	AHLs acylases	59
5.1.5.	Métabolisation des AHLs.....	600
5.1.6.	Autres facteurs inactivant les AHLs.....	60
5.2.	Interférence avec le récepteur (ii).....	60
5.2.1.	Inhibiteurs naturels du récepteur	61
5.2.1.1.	Inhibiteurs procaryotes.....	61
5.2.1.2.	Inhibiteurs eucaryotes	63
5.2.2.	Inhibiteurs synthétiques du récepteur.....	64
5.3.	Inhibition de la protéine synthase (iii).....	66

5.4. Critères de sélection des inhibiteurs du QS (QSI).....	66
5.5. Criblage des molécules QSIs.....	67
6. Bactéries étudiées dans le cadre de la thèse	67
6.1. Souches de la Toulon Collection.....	67
6.2. Genre <i>Pseudoalteromonas</i>	68
6.2.1. Activités biologiques des <i>Pseudoalteromonas</i>	70
6.2.1.1. Activité antibactérienne/Antibiofilm	70
6.2.1.2. Activité antifouling	73
6.2.2. <i>Quorum sensing</i> chez <i>Pseudoalteromonas</i>	73
6.2.3. Description de <i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	74
6.2.3.1. Formation de biofilm de <i>P. ulvae</i> TC14	75
6.2.3.2. Production de pigment pourpre.....	76
6.3. La violacéine	76
6.3.1. Structure et biosynthèse de la violacéine	76
6.3.2. Activités biologiques de la violacéine.....	78
6.3.3. Paramètres influençant la production de violacéine.....	79
7. Objectifs de la thèse	80
Chapitre II : Matériel & Méthodes.....	83
1. Matériel	85
1.1. Souches marines	85
1.2. Biosenseurs.....	86
1.3. Cryoconservation des souches bactériennes.....	87
1.4. Milieux de culture et solutions	87
1.4.1. Vaatanen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar	87
1.4.2. Marine broth (MB) et Marine agar (MA).....	88
1.4.3. Sea Salt (SS).....	89
1.4.4. Luria Bertani broth (LB) ou LB agar	90
1.4.5. Tampon PBS	90
1.5. Conditions de stérilité du matériel.....	91
1.6. Préparation des réactifs et antibiotiques.....	91
2. Méthodes	95
2.1. Culture en conditions planctoniques des bactéries.....	95
2.1.1. Souches marines	95

2.1.2.	Biosenseurs.....	95
2.1.3.	Suivi de croissance des bactéries marines sur 24 heures.....	96
2.2.	Culture en conditions sessiles des souches.....	96
2.3.	Extraction des AHLs	97
2.4.	Détection des AHLs des bactéries marines	98
2.4.1.	Mise en évidence par les biosenseurs.....	98
2.4.2.	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	101
2.4.2.1.	Analyse LC/MS des standards AHLs	102
2.4.2.2.	Optimisation des conditions de la LC/MS	102
2.4.2.3.	Analyse LC/MS des extraits de bactéries	103
2.5.	Tests biologiques avec les AHLs exogènes	103
2.5.1.	Effet des AHLs standards sur l'adhésion des bactéries marines	103
2.5.1.1.	Principe du test d'adhésion	103
2.5.1.2.	Protocole du test d'adhésion	103
2.5.2.	Effet des AHLs standards sur la motilité des bactéries marines	105
2.5.2.1.	Swimming	106
2.5.2.2.	Swarming	106
2.5.2.3.	Twitching	107
2.6.	Etude de la violacéine de TC14.....	108
2.6.1.	Extraction et dosage du pigment	108
2.6.2.	Caractérisation de la violacéine par LC/DAD/MS.....	109
2.6.3.	Cinétique de croissance et de production de la violacéine chez TC14	110
2.6.4.	Effet des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14.....	110
2.6.4.1.	En culture planctonique	110
2.6.4.2.	Effet de la concentration des AHLs	110
2.6.4.3.	En culture sessile.....	111
2.6.5.	Effet des extraits de bactéries sur la violacéine de TC14.....	111
2.6.6.	Effet de l'esculétine sur la violacéine de TC14.....	111
2.7.	Effet des AHLs exogènes sur la formation de biofilm de TC14	112
2.7.1.	Masse de biofilm	112
2.7.2.	Formation de biofilm: Biofilm Ring Test [®]	113
2.8.	Tests préliminaires d'inhibition du Quorum sensing (QSI)	114
2.8.1.	Molécules testées.....	114

2.8.2. Tests QSI	116
2.8.3. Stries croisées 'T-stries' avec TC14 et d'autres bactéries marines	117
3. Analyses statistiques	117

Chapitre III : Identification des AHLs des bactéries marines 119

1. Introduction	121
2. Détection des AHLs des bactéries marines par les biosenseurs	122
2.1. Suivi de croissance des bactéries marines de cette étude	122
2.2. Suivi du pH au cours de la croissance des bactéries marines.....	123
2.3. Choix du milieu de culture des différents types de bactéries	124
2.4. Détection des AHLs avec les biosenseurs	125
2.4.1. Stries croisées (stries T-) entre les bactéries marines et les biosenseurs.....	125
2.4.2. Culture séparée des biosenseurs et bactéries marines	128
2.4.3. Recouvrement après CCM	129
2.4.4. Méthode avec les extraits totaux de bactéries	131
3. Détection des AHLs par LC-ESI-MS.....	132
3.1. Analyses LC-ESI-MS des AHLs standards.....	133
3.2. Analyses LC-MS des extraits de bactéries	135
4. Potentiels rôles de la C ₁₂ -HSL chez la TC15.....	142
4.1. Effet de La C ₁₂ -HSL sur l'adhésion de TC15	1422
4.2. Effet de la C ₁₂ -HSL sur la mobilité de TC15	144
4.3. Effet de la C ₁₂ -HSL sur la formation de biofilm de TC15.....	147
5. Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion des bactéries marines	149
5.1. Sur l'adhésion de la TC8.....	150
5.2. Sur l'adhésion de TC14.....	152
5.3. Sur l'adhésion de 4M6	153
6. Détermination des CE ₅₀ des AHLs exogènes.....	156
7. Effet de quelques AHLs sur la motilité de la 4M6.....	156
8. Conclusion.....	158

Chapitre IV : Régulation phénotypique par des AHLs exogènes chez TC14..... 161

1. Introduction	163
2. Effet des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14.....	164
2.1. Article soumis à la publication	164

2.2. Effet de la concentration des AHLs exogènes sur la production de violacéine	184
3. Effet des AHLs exogènes sur la mobilité de TC14	187
4. Effet des AHLs exogènes sur le biofilm de TC14	190
4.1. Sur la masse de biofilm formé.....	190
4.2. BFRT	192
5. Conclusion.....	198
Chapitre V : Tests d'inhibition du QS	201
1. Introduction	203
2. Tests d'inhibition de QS à partir de bactéries marines et leurs extraits	204
2.1. QSI avec les extraits de bactéries marines	204
2.2. QSI sur gélose avec les bactéries marines.....	206
3. Recherche de référence positive d'inhibition de QS chez TC14.....	208
3.1. Effet de l'esculétine sur la croissance de TC14	208
3.2. Effet de l'esculétine sur la production de violacéine de TC14.....	209
3.3. Effet antagoniste des AHLs exogènes induisant la production de la violacéine et de l'esculétine.....	213
3.4. Effet de l'esculétine sur la mobilité de TC14.....	216
3.5. Effet de l'esculétine sur la formation de biofilm de TC14.....	217
3.6. Effet de l'esculétine sur l'adhésion de TC14	218
4. Tests d'inhibition de QS de <i>C. violaceum</i> et de TC14	219
4.1. Test QSI avec des composés commerciaux	220
4.1.1. Sur le QS de <i>C. violaceum</i> 12472	220
4.1.2. Sur le QS de TC14	223
4.2. Tests QSI avec des analogues synthétiques	225
4.2.1. Sur le QS de <i>C. violaceum</i> 12472	225
4.2.2. Sur le QS de TC14	228
5. Conclusion.....	232
Conclusion générale & perspectives	235
Conclusion générale	237
Perspectives	241
Références bibliographiques	245

Introduction générale

Les bactéries sont des organismes vivants, unicellulaires, qui au cours du temps ont développé une capacité de vie sociale, de communication et d'interaction qui les rend susceptibles de coordonner leur comportement dans un groupe unifié, à l'image des organismes pluricellulaires (Henke & Bassler, 2004 ; Nadell *et al.*, 2009). L'une des formes de vie sociale développée par les bactéries est la vie en biofilm (Nadell *et al.*, 2009).

Le biofilm bactérien correspond à l'agrégation des bactéries sur une surface naturelle ou synthétique (Characklis, 1981). En milieux aquatiques, le biofouling survient après la formation de biofilm. Il correspond à la colonisation par des macroorganismes tels que les spores de macroalgues et des larves d'invertébrés marins. Bien que le biofouling soit un processus tout à fait naturel, la formation de cette structure sur les coques de navires ou tout matériel immergé tels que les ouvrages d'arts, les pipelines et les installations portuaires peut engendrer d'énormes dégâts économiques et écologiques (Champ, 2003; Yebra *et al.*, 2004). En effet, le développement du biofouling sur les coques des bateaux peut engendrer, d'une part, une augmentation de la rugosité de la surface qui conduit à une diminution de la vitesse de navigation, qui à son tour peut entraîner une augmentation considérable de la consommation de carburant. D'autre part, le trafic maritime international demeure un vecteur de la délocalisation et de la propagation d'espèces invasives pouvant perturber profondément certains écosystèmes. Partant de ce fait, l'inhibition des biofilms bactériens par interférence avec leurs systèmes de communication (entre bactéries, mais aussi avec d'autres organismes) pourrait permettre de limiter le développement du biofilm et/ou du biofouling. Même lorsque le biofouling est éliminé par des moyens mécaniques et chimiques, il reste toujours un biofilm résiduel sur certains revêtements hydrophobes par exemple, qui joue toujours un rôle non négligeable sur la trainée hydrodynamique des navires, menant à l'augmentation de l'utilisation de carburant et donc qu'il serait souhaitable d'éliminer.

La vie en biofilm confère aux bactéries plusieurs propriétés que leurs homologues en conditions planctoniques ne possèderaient pas, en l'occurrence la résistance aux agents antimicrobiens, la stabilité, la protection contre les facteurs environnementaux tels que la déshydratation, la salinité, l'exposition aux rayons UV, la phagocytose par d'autres organismes tels que les protozoaires (Mah & O'Toole, 2001). De plus, les bactéries organisées en biofilm sont capables de produire des substances extracellulaires de protection (EPS). L'EPS va permettre la circulation d'eau, d'oxygène et de nutriments, mais aussi de petites molécules signalétiques qui peuvent faire partie des molécules du *quorum sensing* (QS).

Au mode de vie privilégié des bactéries, c'est-à-dire en biofilm, ou encore lorsqu'elles sont suffisamment nombreuses, donc proches en conditions planctoniques, les bactéries peuvent communiquer grâce à un système de communication intra et inter espèce, voire inter genre, qui répond au nom de *quorum sensing* (Li & Tian, 2012). Le QS est le mécanisme utilisé par les bactéries Gram négatif comme positif pour réguler l'expression de divers gènes, de manière synchronisée et dépendante de la densité cellulaire (Fuqua *et al.*, 1994 ; Withers *et al.*, 2001). Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques incluant la production de facteurs de virulence (de Kievit & Iglewski, 2000), l'émission de bioluminescence (Eberhard *et al.*, 1981 ; Visick *et al.*, 2000), la production de pigment (McClellan *et al.*, 1997), la formation de biofilm (Davies *et al.*, 1998 ; Labbate *et al.*, 2004), la motilité (Huber *et al.*, 2001)... Chez les bactéries Gram négatif, le QS implique la production et la réponse à de petites molécules signalétiques appelées *N*-acyl homosérine lactones (AHLs) (Fuqua *et al.*, 1994 ; Salmond *et al.*, 1995). Les AHLs sont généralement produites par une enzyme, une synthase et diffusent passivement à travers la membrane cellulaire. Lorsque leur concentration atteint un seuil critique dans le milieu extérieur, généralement à densité cellulaire élevée, les AHLs pénètrent dans la cellule, se fixent et activent les récepteurs intracellulaires spécifiques. Les récepteurs ainsi activés se lient aux promoteurs de gènes cibles et régulent leur transcription (Fuqua *et al.*, 1994).

Le QS et le biofilm sont donc interconnectés puisque le QS contrôle la formation et la maturation de biofilm chez plusieurs espèces bactériennes notamment *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Serratia liquefaciens* MG1, *Burkholderia cepacia* H111 (Kjelleberg & Molin, 2002; Parsek & Greenberg, 2005), pour ne citer que celles-là. Parce que le QS contrôle dans bien des cas la formation du biofilm bactérien, sa perturbation pourrait en inhiber la formation et par conséquent, prévenir le développement du biofouling microbien (Dobretsov *et al.*, 2009). Actuellement, les recherches de stratégies antibiofilm sont orientées vers l'identification de molécules interférant avec le QS bactérien, pouvant permettre de développer des agents antibiofilm voire antifouling. Parmi ces molécules, il existe des métabolites secondaires provenant de divers organismes marins tels que les bactéries, les algues, les éponges, les diatomées, les champignons et les cyanobactéries (Dobretsov *et al.*, 2006). De ce fait, les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ont été largement décrites comme produisant de large éventail de molécules bioactives à caractère antifouling (Holmström & Kjelleberg, 1999). Ainsi, des signaux QS produits par certaines bactéries peuvent fortement

interférer avec le QS d'autres bactéries et empêcher la formation de biofilm chez ces dernières.

Il est bien de noter que le milieu marin, plus précisément la Mer Méditerranée, renferme une diversité d'espèces bactériennes qui ont montré leur capacité à former du biofilm *in situ* et *in vitro* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Camps *et al.*, 2011 ; Danoravo *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008). L'un des moyens proposés pour le contrôle des biofilms marins étant l'inhibition du système de communication QS, il s'avère intéressant d'identifier les signaux AHLs impliqués dans ce processus. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif principal de cette thèse qui est la mise en évidence de l'existence d'un système de communication de type QS impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée, particulièrement chez la souche *Pseudoalteromonas ulvae* (TC14), productrice de violacéine en milieu marin. Cette étude met également en évidence le lien potentiel du QS avec la formation du biofilm des bactéries marines, afin d'identifier des molécules antibiofilm non toxiques, pouvant perturber le système de communication bactérien.

Chapitre I
Etude bibliographique

1-Biofilm/Biofouling

1.1. Origine et définition

Le biofouling ou bio-salissure marine est le processus naturel de colonisation de tout support inerte ou vivant, immergé dans l'eau ou en atmosphère humide, par des micro et macroorganismes (Characklis, 1981).

La colonisation des surfaces est très rapide. Elle commence par la fixation de macromolécules au support qui forment en quelques secondes un film conditionnant. En l'espace de quelques minutes, viennent adhérer de façon réversible puis de façon irréversible, les premières bactéries. D'autres microorganismes tels que les diatomées peuvent adhérer également et former avec les bactéries le microfouling. Quelques jours à quelques mois plus tard en fonction de l'environnement, survient la fixation des macroorganismes, menant à la formation du macrofouling (Characklis, 1981) (Figure 1). Les macroorganismes quant à eux incluent les algues, les éponges, les balanes et les invertébrés (Lejars *et al.*, 2012) (Figure 2)

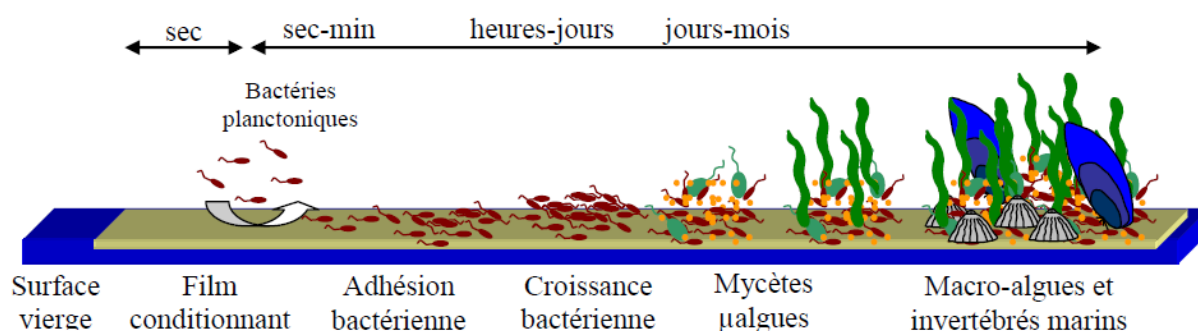


Figure 1 Formation du biofouling sur une surface immergée (Haras, 2005).

La formation de biofilms bactériens est initiée par l'agrégation de bactéries sur une surface qu'elle soit naturelle (dent, intestins de l'homme...) ou artificielle (tuyauteries de condensation exposés à un écoulement turbulent de l'eau, coques de navires). Du fait de leur quantité relative élevée dans l'environnement, les bactéries sont quasiment présentes sur toutes les surfaces. En revanche, le terme de biofouling correspondant à l'agrégation de macroorganismes, est préférentiellement utilisé dans le cadre d'études environnementales, en particulier dans le secteur marin, l'adhésion de macroorganismes étant quasiment nulle ou moins retrouvée dans d'autres secteurs d'activité (médical...). Le biofilm est donc un phénomène qui touche de nombreux secteurs d'activité. En plus de constituer un véritable

enjeu de santé publique, la formation de biofilms handicape lourdement l'industrie agroalimentaire et bien entendu les industries du secteur marin.

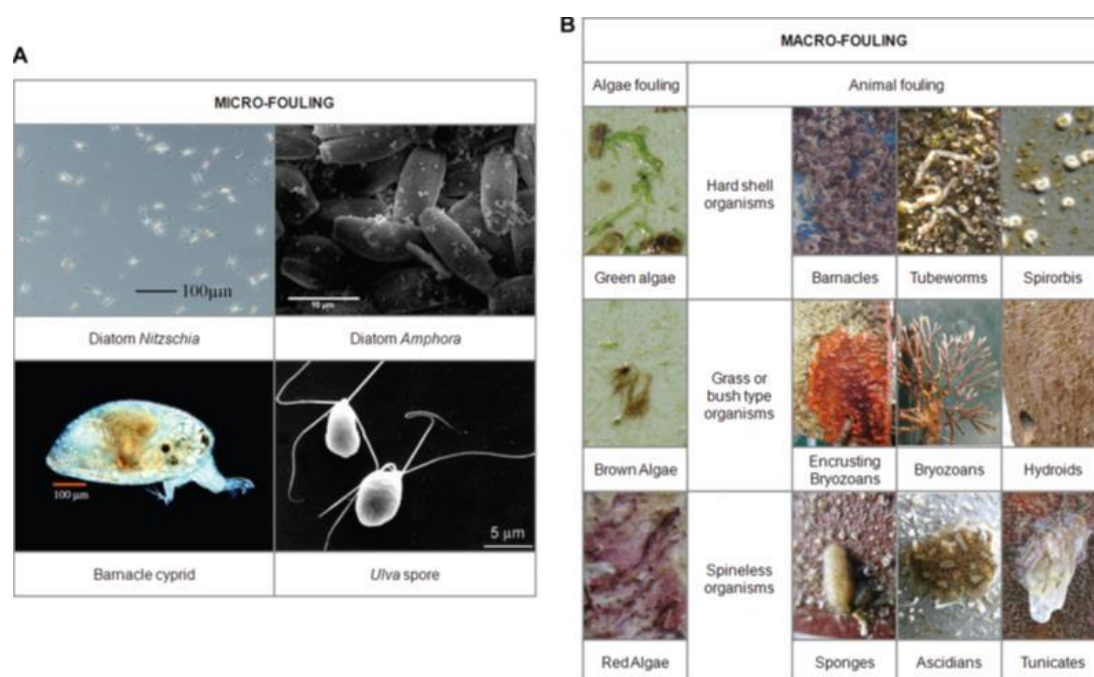


Figure 2 Micro et macroorganismes marins (Lejars *et al.*, 2012).
Micro et macroorganismes marins retrouvés sur les surfaces artificielles immergées en eau de mer.

1.2. Biofilm marin

Le biofilm marin est le phénomène naturel de colonisation spontanée des coques de bateaux, des canalisations et des installations fixes immergées dans les ports par des microorganismes marins tels que les bactéries, les diatomées et les protozoaires (Salta *et al.*, 2013). C'est une communauté d'organismes enveloppée dans une matrice extracellulaire appelée substance polymérique extracellulaire (EPS). Les biofilms matures ont une structure tridimensionnelle complexe qui dépend de la composition chimique et organique du biofilm, de l'activité microbienne et des conditions environnementales. La plupart du temps, ils sont constitués de bactéries hétérotrophes telles que les protéobactéries, les cyanobactéries et les archées (Dobretsov *et al.*, 2013).

1.3. Mécanisme de la formation du biofilm

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée comporte plusieurs étapes successives dont, le conditionnement de la surface, l'adhésion réversible et irréversible des bactéries à la surface, la maturation et le détachement partiel ou dispersion du biofilm (Characklis, 1981 ; Haras, 2005). Ces différentes étapes sont résumées dans la Figure 3.

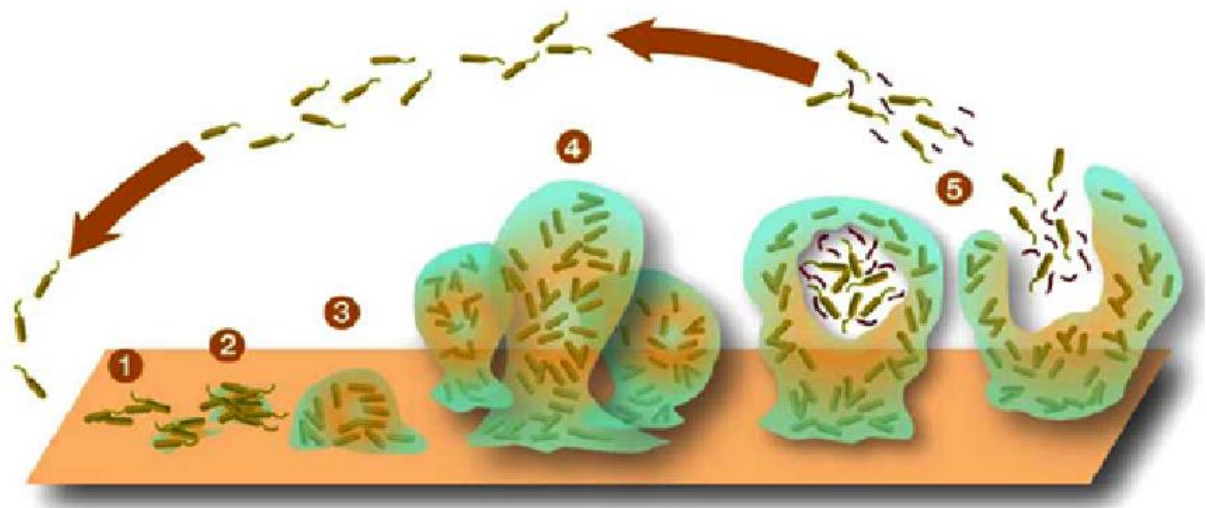


Figure 3 Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Stoodley *et al.*, 2002).

(1) Attachement initial des cellules à la surface (2) Attachement irréversible des cellules et production d'EPS (3) Développement précoce de l'architecture du biofilm. (4) Maturation du biofilm (5) Dispersion des cellules du biofilm

1.3.1. Le conditionnement de la surface par le milieu

Une surface immergée est le siège d'adsorption de molécules organiques et d'ions qui conduit à la formation d'un film conditionnant. Ce phénomène peut créer des micro-niches favorables à l'adhésion stable des bactéries qui y trouvent disponibles des nutriments avec lesquels elles peuvent engager des interactions spécifiques (Haras, 2005).

1.3.2. L'adhésion des bactéries

L'adhésion des bactéries à une surface est d'abord réversible puis irréversible (Haras, 2005). Elle peut être conditionnée par les propriétés dynamiques du milieu telles que la vitesse d'écoulement du fluide et les propriétés physico-chimiques, dont les interactions spécifiques entre la surface et la bactérie (Characklis, 1981 ; van Loosdrecht *et al.*, 1990). Les

flagelles jouent un rôle essentiel dans le déplacement et l'attachement initial des bactéries au cours de la formation du biofilm (Davey & O'toole, 2000).

1.3.2.1. Adhésion réversible

Au cours de l'adhésion réversible, les bactéries établissent des interactions faibles de type Van der Waals et électrostatiques avec la surface conditionnée. L'adhésion des bactéries est facilitée si les conditions de flux sont proches de zéro. Des interactions spécifiques entre la surface et les macromolécules exprimées à la surface de la bactérie s'établissent. Tant que ces interactions ne sont pas établies, la bactérie peut se désorber rapidement de la surface et retrouver son état planctonique (Haras, 2005).

1.3.2.2. Adhésion irréversible

L'adhésion irréversible des bactéries est caractérisée par des interactions covalentes fortes, grâce aux macromolécules de surface bactérienne telles que les polysaccharides, les protéines et lipopolysaccharides (Haras, 2005). Chez la plupart des bactéries, elle se fait grâce à des appendices extracellulaires, qui ne sont pas obligatoirement indispensables au maintien du biofilm mature. Il s'agit des flagelles et des pili de type I et IV. Les flagelles et les pili de type IV jouent aussi un rôle dans le déplacement de la bactérie sur la surface (Davey & O'toole, 2000 ; Hall-Stoodley & Stoodley, 2002). Le déplacement des individus au cours de l'adhésion bactérienne et ultérieurement la formation de biofilm, favorise la recherche d'une niche favorable à leur développement, pouvant mettre en jeu des mécanismes de compétition pour les ressources et de défense ou de fuite face à leurs prédateurs (Brockhurst *et al.*, 2006). D'une manière générale, l'adhésion se fait principalement grâce à des protéines adhérentes appelées adhésines, qui se trouvent dans la membrane des bactéries (y compris celles se trouvant au niveau des appendices extracellulaires). Nous pouvons citer par exemple, les protéines liant le fibrinogène (ClfA et ClfB) chez les staphylocoques, qui sont impliquées dans la colonisation d'implants (Hawiger *et al.*, 1982 ; Ní Eidhin *et al.*, 1998). D'autres molécules telles que les polysaccharides de surface peuvent aussi jouer un rôle essentiel dans l'adhésion et l'agrégation des bactéries. C'est le cas de l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA), qui joue un rôle primordial dans la colonisation des matériaux biomédicaux chez *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* (Cramton *et al.*, 1999; Rupp *et al.*, 1999).

1.3.3. *Maturation du biofilm*

Une fois les bactéries adhérees de manière irréversible, elles se multiplient et leur croissance conduit à la formation de colonies, qui recouvrent tout ou une partie de la surface. Cette étape peut être atteinte sous 24 heures selon les cas et peut durer jusqu'à dix jours en fonction des souches (Heydorn *et al.*, 2000). Le niveau de colonisation est multiparamétrique, puisqu'il dépend des microorganismes en présence (espèces, souches...), des conditions du milieu (température, durée, substrats...), mais aussi des propriétés de la surface (van Loosdrecht *et al.*, 1990). En effet, selon Haras en 2005, le biofilm formé en 48h sur une lame de verre hydrophile par une bactérie hydrophile (*Vibrio* sp.) recouvre toute la surface du verre tandis que le biofilm formé par une bactérie modérément hydrophobe (*Pseudoalteromonas* sp.) est composé d'amas différenciés.

C'est au cours de l'étape de la maturation que la bactérie développe l'architecture de sa matrice extracellulaire de protection, composée de substances polymériques extracellulaires (EPS), qui représente environ 60 à 98% du poids sec du biofilm mature (Flemming & Wingender, 2010 ; Siegert, 1999). L'EPS est composée de molécules organiques telles que protéines, lipides, polysaccharides et ADN, mais aussi d'eau (Flemming & Wingender, 2010). C'est également au cours de la maturation que la bactérie développe la résistance aux antibiotiques et aux agents de stress environnementaux (Anwar *et al.*, 1992). Ces caractéristiques qui confèrent aux bactéries un environnement protecteur constituent néanmoins de véritables problèmes cliniques et environnementaux (O'Toole *et al.*, 2000 ; Yebra *et al.*, 2004). Outre les considérations cliniques et environnementales, les bactéries au sein du biofilm peuvent aussi développer d'autres propriétés parmi lesquelles l'augmentation de la résistance aux rayons UV, l'augmentation des taux d'échange génétique, l'altération des capacités de biodégradation, l'augmentation de la production des métabolites secondaires, ainsi que l'utilisation de la communication inter-bactéries appelée *quorum sensing*, grâce à de petites molécules signalétiques qui régulent l'expression de certains gènes (Haras, 2005; O'Toole *et al.*, 2000).

1.3.4. *Dispersion*

La perte des cellules d'un biofilm peut être due soit à une lyse cellulaire, soit au départ de cellules viables qui peut s'effectuer tout au long de la formation du biofilm en réponse à un changement d'environnement (Haras, 2005). Plusieurs mécanismes conduisant à la perte de cellules intactes ont été décrites par Sauer et collaborateurs en 2002. Il s'agit de la limitation

de la disponibilité en oxygène dans les biofilms épais, des forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, de la diminution des nutriments disponibles et de la modification de leur composition (Sauer *et al.*, 2002). Selon O'Toole *et al.* en 2000, l'une des causes de la dispersion des cellules dans un biofilm serait le manque de nutriments (famine), qui conduit au détachement des cellules du biofilm vers des d'autres habitats riches en nutriments.

1.4. Substances polymériques extracellulaires (EPS)

Le mode de vie en biofilm n'est possible que parce que les organismes du biofilm sont transitoirement immobilisés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires aussi connue sous le nom de «slime» (Flemming, 2011). L'EPS est la caractéristique commune de tous les biofilms microbiens. Selon Flemming en 2011, elle peut être considérée comme “la maison” des cellules du biofilm au sein de laquelle elles organisent leur vie. Elle est constituée en majeure partie d'eau mais aussi de polysaccharides, d'acides nucléiques et de protéines dont des enzymes extracellulaires retenues sous forme de complexes polysaccharidiques consolidés, qui participent à sa formation et à sa structuration (Flemming & Wingender, 2010; Stoodley *et al.*, 2002). Les exopolysaccharides produits par les bactéries les aident à s'attacher fermement à la surface inerte et à avoir une bonne cohésion du biofilm (Anwar *et al.*, 1992). Un exemple d'interaction entre exoenzymes et exopolysaccharides est la complexation de la lipase par l'alginate chez *Pseudomonas* (Flemming, 2011; O'Toole *et al.*, 2000). En plus des exoenzymes et exopolysaccharides, il est noté en forte proportion, la présence de matériel génétique tel que les ADN extracellulaires (Allesen-Holm *et al.*, 2006). La production de matrice de polymères par les bactéries peut être détectée par plusieurs méthodes dont la coloration au bleu alcian (Sauer *et al.*, 2002). Le sous-chapitre 1-7 sera consacré à énumérer les principales méthodes d'étude du biofilm et de l'EPS.

1.5. Développement des bactéries en biofilm

Le développement au sein du biofilm se traduit par les changements morphologiques et physiologiques qui jouent un rôle essentiel dans le cycle de vie des organismes (O'Toole *et al.*, 2000). Les bactéries subissent une transition de l'état solitaire (planctonique) à l'état communautaire (biofilm), dans lequel elles doivent interagir avec plusieurs voisins de différentes espèces. Des modifications phénotypiques et génétiques ont souvent été observées après l'adsorption à la surface chez plusieurs bactéries. Parmi les changements phénotypiques,

morphologiques, il y a par exemple le passage de la forme végétative à la forme sporulée chez *Bacillus subtilis* et chez *Myxococcus xanthus* (Branda *et al.*, 2001 ; Jelsbak & Søggaard-Andersen, 2003), le changement de motilité chez *Caulobacter crescentus*, qui passe de la nage libre à une forme immobile (O'Toole *et al.*, 2000), la sur-régulation de l'alginate chez *P. aeruginosa* (Davies *et al.*, 1993) et la rotation des flagelles polaires en position latérale chez *Vibrio parahemolyticus* (McCarter & Silverman, 1990).

Les changements fonctionnels dans les cellules en biofilm impliquent la physiologie et la résistance à l'environnement des cellules (O'Toole *et al.*, 2000). La physiologie des cellules en biofilm est extrêmement complexe et profondément différente de celle des cellules planctoniques. De façon générale, le développement des microorganismes sur une surface solide peut modifier profondément leurs activités métaboliques (Anwar *et al.*, 1992; van Loosdrecht *et al.*, 1990). L'état physiologique des cellules du biofilm est hétérogène et dépend de la localisation de chaque cellule individuelle dans les multiples couches de cellules qui forment le biofilm (Anwar *et al.*, 1992). En effet, les cellules situées à la surface du biofilm ont un accès plus facile aux nutriments et à l'oxygène. Elles sont donc morphologiquement et métaboliquement similaires aux cellules planctoniques. En revanche, les cellules enchevêtrées dans la matrice sont métaboliquement moins actives en raison de l'accès difficile aux nutriments et à l'oxygène. Par ailleurs, elles sont moins sujettes aux stress de diverses origines tels que les agents antimicrobiens et les attaques par phagocytoses, contrairement aux cellules surfaciques et planctoniques (Anwar *et al.*, 1992).

1.6. Conséquences de la formation du biofilm

Les incidences de la formation de biofilm sur différentes surfaces sont variées et se rapportent à plusieurs secteurs d'activité allant du secteur sanitaire à l'environnement marin (Haras, 2005).

1.6.1. Secteur biomédical

De nombreuses infections sont dues à la formation de biofilm sur différentes parties du corps humain, telles que les surfaces bucco-dentaires (Figure 4A), les tractus urinaire et intestinal, les parois pulmonaires ou encore la peau (Reid, 1999; Trautner & Darouiche, 2004). De plus, des dispositifs médicaux implantés tels que les valves cardiaques, les cathéters et les prothèses sont particulièrement vulnérables à la formation des biofilms microbiens et demeurent une cause de mortalité (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Chez l'homme, la formation de biofilm par plusieurs espèces pathogènes, telles que *P. aeruginosa* et *Vibrio cholerae*, est à l'origine de nombreuses maladies (Hall-Stoodley & Stoodley, 2005). C'est le cas de l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* dans l'état de biofilm qui est la première cause de morbidité chez les patients atteints de fibrose kystique (Geske *et al.*, 2005).



Figure 4 Quelques images de conséquences du biofilm.
(A) Biofilm sur une plaque dentaire (<http://fr.wikipedia.org>) (B) Biofouling sur une coque de bateau (Yebra *et al.*, 2004).

1.6.2. *Domaine agro-industriel*

Même en étant de taille réduite, le biofilm microbien peut être extrêmement problématique en industrie agroalimentaire. En effet, il peut entraîner la bio-corrosion des surfaces et le colmatage des systèmes de filtration. De plus, il favorise le développement de flores pathogènes ou d'altération capables de résister aux différentes procédures de désinfection sur les équipements industriels, provoquant ainsi un véritable enjeu de santé publique (Haras, 2005; Mah & O'Toole, 2001). Cependant, toujours dans le domaine industriel, les biofilms bactériens peuvent jouer un rôle bénéfique. C'est le cas du biofilm de *Bacillus subtilis* et espèces apparentées qui permet de contrôler les infections causées par les pathogènes des plantes et favorise la réduction de la corrosion des surfaces en acier doux (Morikawa, 2006).

1.6.3. Environnement marin

En milieu marin, la formation de biofilm peut comporter d'énormes conséquences à la fois économiques et environnementales (Lejars *et al.*, 2012). Ces effets indésirables sont bien connus et concernent surtout les navires.

1.6.3.1. Incidences économiques

Les incidences économiques liées au développement du biofilm et/ou du biofouling sur les coques des navires sont nombreuses (Figure 4B). La rugosité de la coque des bateaux, du fait de la présence du biofouling entraîne un accroissement de la traînée hydrodynamique, qui selon Schultz *et al.* en 2007 pourrait varier de 33 à 187% en fonction de l'épaisseur de la salissure, causant ainsi une diminution de la vitesse de navigation et de la maniabilité. Pour y remédier, une augmentation de la vitesse de navigation s'avère nécessaire, ce qui conduit généralement à une élévation de la consommation de carburant (Schultz, 2007). Tout ceci a pour conséquence une augmentation du coût opérationnel des navires (Schultz *et al.*, 2011). Selon (Champ, 2000), la consommation de carburant par les navires peut augmenter de 44 à 77% en fonction du type de navires. Aussi, (Salta *et al.*, 2013) ont estimé à environ 56 millions de dollars par an les coûts primaires liés à l'augmentation de la consommation de carburant due au biofouling, pour toute la classe de navires militaires DDG-51. Ainsi, même si le développement des salissures est faible et qu'il n'y a qu'un biofilm, un effet non négligeable sur la consommation de carburant des navires peut être observé.

1.6.3.2. Incidences écologiques

Les incidences écologiques liées au biofilm ou au biofouling sont nombreuses et peuvent être de diverses origines. D'abord, la consommation abusive de carburant par les navires peut engendrer une émission de composés nocifs et de déchets toxiques, due à la forte combustion de carburant dans la mer et dans l'atmosphère. Ce qui peut s'avérer être délétère pour les organismes marins. De plus, les biocides incorporés dans les revêtements antifouling des bateaux peuvent être relargués dans la mer et avoir un effet néfaste sur les organismes marins (Preston & Shackelford, 2002).

Un autre aspect des conséquences écologiques, et qui n'est d'ailleurs pas le moindre, est la délocalisation des espèces non natives pouvant correspondre à des espèces invasives (Yebra *et al.*, 2004). En effet, l'introduction des espèces exotiques invasives dans un

environnement peut avoir un impact considérable sur le potentiel économique, les valeurs environnementales et sociales ainsi que la stabilité des régions concernées. Les ports et les rades ont été désignés comme étant les principaux points où l'augmentation de la fréquence et de l'abondance des espèces non-indigènes est observée. L'expédition internationale reste l'un des vecteurs les plus importants, responsables de leur propagation entre régions (Piola *et al.*, 2009). Selon Reise *et al.* en 1998, environ quatre-vingt espèces non indigènes (principalement des invertébrés : crustacées, mollusques, polychètes et hydroïdes) sont supposées avoir été introduites dans les mers du nord par expédition transocéanique (Reise *et al.*, 1998). De plus, environ vingt taxons de macroalgues rouges et brunes introduites dans les mers du nord. L'introduction de ces espèces exotiques peut parfois aboutir à des changements environnementaux marquants, dont il existe plusieurs exemples dans la littérature. Il est cité entre autres, l'introduction du cténophore de l'Ouest-Atlantique *Mnemiopsis leidyi* dans la mer noire, qui a entraîné le déclin de la pêche régionale d'anchois (Travis, 1993). Il est cité également, l'introduction et l'invasion de l'algue verte tropicale *Caulerpa taxifolia* dans la mer Méditerranée qui aurait interféré avec les herbes marines natives *Posidonia oceanica* et *Cymodeca nodosa*, induisant leur régression (Ceccherelli & Cinelli, 1997). Diverses maladies auraient également été introduites chez les huîtres et les poissons, ainsi que des algues toxiques dans le plancton (Reise *et al.*, 1998).

1.7. Principales techniques d'analyses de biofilm sur surfaces abiotiques

Différentes méthodes ont été utilisées pour qualifier et quantifier les biofilms sur des surfaces abiotiques. (Pantanella *et al.*, 2013) ont décrit quinze méthodes principales qui sont utilisées de nos jours pour étudier les bactéries en mode de vie social, c'est-à-dire en biofilm. Ces différentes méthodes peuvent être classées en fonction de la technique de base utilisée. Il s'agit des méthodes de quantification effectuées en microplaques et des méthodes d'observation microscopiques. La majeure partie de ces méthodes se réalisent soit à partir d'indicateurs colorimétriques, soit à partir de marqueurs fluorescents.

1.7.1. Techniques de quantification en microplaques

Dans la dernière décennie, différents tests réalisés en microplaques se sont développés. Elles restent des méthodes intéressantes car elles permettent de gagner en temps et en efficacité (plusieurs souches testées à la fois). Le principe étant de quantifier de manière

indirecte les biofilms formés par les organismes, en utilisant soit des colorants soit des fluorochromes.

1.7.1.1. Méthodes colorimétriques

C'est une méthode de quantification des biofilms en microplaque. Plusieurs indicateurs colorimétriques peuvent être utilisés. Le plus connu et le plus utilisé est le cristal violet (CV) qui permet de colorer les cellules chargées négativement aussi bien que les polysaccharides des EPS (Amaya *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2003; Pantanella *et al.*, 2013).

Outre le CV, divers autres colorants peuvent servir à quantifier les biofilms. Il existe notamment le bleu 1,9 diméthyle-méthylène (BDMM) qui se lie préférentiellement aux polysaccharides de la matrice du biofilm (Toté *et al.*, 2008), la résazurine qui permet de quantifier le nombre réel de cellules viables dans un biofilm et d'avoir des informations sur l'activité du biofilm (Peeters *et al.*, 2008; Punithavathy *et al.*, 2012). Pour toutes ces techniques, la mesure d'absorbance des colorants utilisés se fait par spectrophotométrie et permet d'obtenir une information quantitative.

1.7.1.2. Méthodes de fluorescence

Une technique similaire de quantification des biofilms en microplaque est basée sur l'utilisation de fluorochromes. C'est une technique d'analyse de biofilm émergente qui consiste à marquer soit les cellules du biofilm, soit leurs acides nucléiques en l'occurrence l'ADN par des fluorochromes et à lire l'intensité de fluorescence des cellules à partir d'un lecteur de microplaques. Elle ne renseigne cependant pas sur les EPS des bactéries. Les fluorochromes les plus souvent utilisés sont le Syto[®]61, le Syto[®]9 (Camps *et al.*, 2011) et le DAPI (Leroy *et al.*, 2007). Elle permet aussi d'évaluer de la quantité de bactéries présentes sur la surface. Des marquages fluorescents ciblant des composés de la matrice sont en cours de développement. Des observations microscopiques doivent cependant venir en complément des marquages aux fluorochromes afin de renseigner sur la structure des biofilms.

1.7.1.3. Méthodes radioactives

C'est une méthode de quantification de biofilm ou de l'activité métabolique des bactéries du biofilm en microplaque, basée sur l'incorporation de substances radioactives, telles que la [¹⁴C] leucine ou la [³H] thymidine. L'utilisation d'un radiotraceur par les bactéries donne en effet une idée sur leur activité métabolique, ce qui se traduit par un

marquage des bactéries elles-mêmes. Des trois méthodes précitées, (Vesterlund *et al.*, 2005) ont montré qu'elle était la plus sensible.

1.7.1.4. Méthodes magnétiques

Depuis quelques années, a émergé une nouvelle technique de quantification de biofilm basée non pas sur l'utilisation des fluorochromes ou d'indicateurs colorimétrique mais sur la mobilité de microbilles magnétiques au sein de la matrice des biofilms. Elle est connue sous le nom de Biofilm Ring Test[®] (BFRT[®]) (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Chavant *et al.*, 2007).

Le BFRT[®] permet d'évaluer la quantité de biofilm bactérien formé en microplaques. Son principe repose sur la mesure de la mobilité de microbilles magnétiques ajoutées à une culture bactérienne au fond des puits d'une microplaque. Après différents temps d'incubation, les puits sont soumis à une aimantation puis les microplaques sont scannées avec un lecteur développé par Biofilm Control[®]. En absence de biofilm, les microbilles sous l'influence du champ magnétique migrent au centre du puits et forment un spot foncé. S'il y a formation d'un biofilm, les microbilles sont piégées dans la matrice extracellulaire et ne peuvent pas migrer au centre du puits lors de l'aimantation. Il n'y a donc pas de formation de spot au centre du puits (Figure 5).

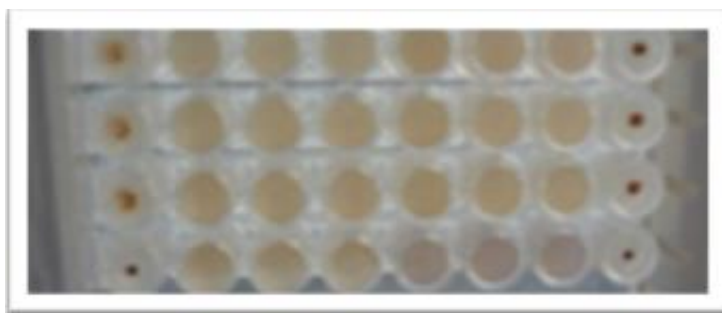


Figure 5 Photos de microplaques du BFRT.

Microplaque BFRT après aimantation : spots visibles au centre de certains puits. Dans d'autres puits, le biofilm formé empêche le regroupement des microbilles en spot.

1.7.2. Méthodes microscopiques

Les techniques microscopiques ont connu une avancée continuelle depuis ces dernières décennies. Elles permettent une analyse directe et détaillée des biofilms qui varie en fonction du type de microscope utilisé. En effet, les microscopes électroniques à transmission et à balayage (MET et MEB) permettent une étude morphologique à savoir la répartition

spatiale ainsi que la structure du biofilm (Wimpenny *et al.*, 2000), tandis que la microscopie à épifluorescence et à balayage laser confocal permet en plus, la quantification des bactéries dans les biofilms au préalable marquées par des fluorochromes ou des marqueurs colorimétriques. Des méthodes de microscopies plus sophistiquées ont été développées telles que le microscope confocal Raman (MCR) qui renseigne sur les composants des EPS des biofilms (Chao & Zhang, 2012; Karygianni *et al.*, 2012). La Figure 6 montre des images au microscope électronique à balayage (MEB) et au microscope confocal à balayage laser de biofilm âgé de cinq jours de *P. aeruginosa* (West *et al.*, 2007).

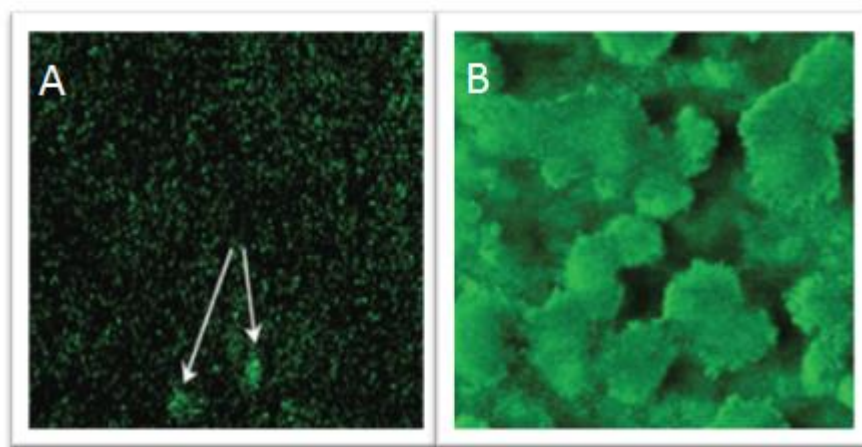


Figure 6 Images Microscopiques de *P. aeruginosa* fixé sur un coupon en acier inoxydable. (A) Microscope électronique à balayage (MEB) avec observation des microcolonies (B) Microscope confocal à balayage laser de biofilm âgé de cinq jours (West *et al.*, 2007).

2. Antifouling

2.1. Définition et principe

Le principe des stratégies antifouling (AF) consiste à éliminer les organismes vivants qui se fixent sur les surfaces immergées grâce à la libération de substances nocives. La principale stratégie AF consiste en l'utilisation de revêtements afin d'empêcher la fixation des organismes marins sur les coques des navires. (Dafforn *et al.*, 2011). Plusieurs approches AF utilisant divers types de biocides ont été développés jusqu'à ce jour, allant des composés chimiques, aux analogues synthétiques de molécules naturelles. L'utilisation généralisée des peintures AF à couvrir 70% de la flotte mondiale actuelle, a conduit à d'énormes retombées économiques (Champ, 2003 ; Yebra *et al.*, 2004).

2.2. Historique et régulation

Les stratégies AF ont été développées en étroite collaboration avec le transport maritime de personnes et de marchandises. Il y a plus de 2000 ans, les bateaux de commerce et les navires de guerre étaient lourdement handicapés par la masse de microorganismes qui se déposaient sur les coques en bois. Pour conserver leur vitesse d'origine et éviter que des mollusques ne rongent les coques, les Phéniciens, les Egyptiens et les Romains y apposaient déjà des plaques de cuivre ou de plomb. Plus tard, au XVIII^e siècle, les chantiers navals ont généralisé l'utilisation des feuilles de cuivre, clouées sur les parties immergées de la coque (Dafforn *et al.*, 2011). Les coques des navires ont ainsi été revêtues avec des systèmes antisalissure contenant des composés toxiques. Peu à peu, les lourdes plaques de cuivre ont été remplacées par l'application de peintures à base de biocides. L'un des biocides les plus connu est le tributylétain (TBT) qui s'est avéré très efficace mais cependant très toxique et polluant, notamment à cause de l'étain qu'il contenait. Ses effets toxiques pour l'homme (directement par inhalation ou indirectement par ingestion de coquillages) et pour l'environnement (perturbations hormonales chez les organismes vivants) ont motivé son interdiction depuis Janvier 2003 dans le cadre des conventions de l'Organisation Maritime Internationale (OMI).

2.2.1. Historique du TBT

Le TBT a tout d'abord été utilisé dans les systèmes d'eaux douces pour éradiquer les mollusques hébergeant le trématode parasite *Schistosoma*. Ce n'est que dans les débuts des

années 1960 qu'il a été introduit dans les peintures marines AF (peintures AF) en tant que biocide. Ainsi, il a été incorporé dans les peintures classiques de type SPC, dont le principe reposait sur la lixiviation passive de la matrice soluble qui libérait les substances toxiques inhibant la croissance d'organismes indésirés. Parmi toutes les différentes solutions proposées tout au long de l'histoire de la navigation, les peintures à base de copolymères auto-polissant de tributylétain ont donné les meilleurs résultats dans la lutte contre le biofouling sur les navires (Champ, 2003).

2.2.2. Impact du TBT sur l'environnement marin

La prise de conscience des problèmes écologiques liés au TBT s'est faite dans le début des années 1980 lorsque plusieurs exploitations ostréicoles en France ont connu des baisses considérables en raison d'anomalies observées dans le développement larvaire et des malformations de coquillage touchant 80 à 100% des huîtres individuelles (Alzieu, 1991). Plusieurs plans d'eaux semi-fermés ont été contaminés par de fortes concentrations de TBT à divers endroits dans le monde et notamment en France. Aussi, il a été montré que de faibles concentrations de TBT (1-2 ng/L) pouvaient affecter la calcification des coquilles d'huîtres ou provoquer l'imposex, qui correspond au développement d'organes génitaux mâles chez les gastéropodes femelles (Evans *et al.*, 1995).

L'impact du TBT sur les organismes marins a poussé de nombreux gouvernements dans le monde à limiter son utilisation. La France a été le premier pays à interdire en 1982 l'application des peintures AF à base de TBT sur les navires de moins de vingt-cinq mètres de long (< 25 m) (Alzieu *et al.*, 1986). Des restrictions similaires ont été adoptées sur les petits navires dans d'autres pays d'Europe (1989), notamment au Royaume-Uni (1987) mais aussi en Australie (1989), aux USA (1988) et au Canada (1989) (Champ, 2000). Cependant, les navires commerciaux ont continué l'utilisation du TBT, limité à de faibles quantités. En outre, une convention internationale de l'OMI en 2001 a déclaré l'interdiction des peintures AF à base de TBT à compter du 1^{er} janvier 2003 et la présence de ce type de peintures à la surface des navires à partir du 1^{er} janvier 2008 (date d'effet) (Champ, 2001). Le Tableau 1 résume l'historique des procédés antifouling développés jusqu'à l'interdiction du TBT.

Tableau 1 Historique de l'évolution des stratégies antifouling
Adapté de (Dafforn *et al.*, 2011)

Chronologie	Les grands évènements
1500-300 BC	Utilisation de Plomb (Pb) et Cuivre (Cu)
1800-1900	Métaux lourds (Cu, arsenic, mercure) incorporés dans les revêtements.
1900 à nos jours	Utilisation continue du cuivre dans les revêtements AF.
1960	Développement de revêtements classiques à base de TBT
1974	Signalement de croissance anormale de la coquille des huîtres par les ostréiculteurs.
1980	Développement de revêtements à auto polissage à base de TBT qui permet le contrôle du taux de libération des biocides.
1980	Liaison du TBT aux anomalies de coquilles des huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>) et à l'imposex chez le dogwhelk (<i>Nucella lapillus</i>)
1987-1990	Interdiction des revêtements contenant du TBT sur les bateaux inférieurs à 25 m de long en France d'abord puis au Royaume-Uni, aux USA, au Canada, en Union Européenne, au Japon et en Nouvelle Zélande
1990-2000	Restriction de la vitesse de libération du Cu introduit au Danemark et considéré ailleurs.
2000	Evolution de la recherche d'alternatives AF respectueuses de l'environnement
2001	Adoption par l'OMI de la convention AFS pour l'élimination du TBT des navires : 2003: Interdiction d'une nouvelle application du TBT dans les revêtements
2008	2008: Interdiction de la présence de TBT actif Entrée en vigueur de la convention AFS.

2.3. Différentes stratégies AF

Les stratégies AF actuelles peuvent être divisées en deux catégories principales. Les revêtements chimiquement actifs qui incluent l'incorporation de composés toxiques qui agissent sur les organismes marins en limitant ou en inhibant leur développement et les revêtements non toxiques, qui inhibent le dépôt des organismes ou améliorent le relâchement des organismes installés, sans intervention de produits chimiques toxiques (Lejars *et al.*, 2012) (Tableau 2).

2.3.1. Revêtements AF chimiquement actifs

2.3.1.1. Revêtements à base de biocides

Les revêtements à base de biocides ont pour objectif la libération contrôlée des molécules chimiquement actives, incorporées dans la matrice de polymères appelée «binder». La plupart des peintures AF sont enrichies avec des biocides connus sous le nom de booster-biocides. Les booster-biocides sont souvent des herbicides qui ont des effets négatifs sur le taux de croissance des organismes photosynthétiques (Voulvoulis *et al.*, 1999). Il s'agit de l'oxyde de cuivre, de l'Irgarol 1051, du diuron, du dichloro octylisothiazolinone (DCOIT), du Sea-Nine 211, du dichlofluanide, du chlorothanonil, du pyrithione de zinc, du pyrithione de cuivre, de l'éthylène-bis-dithiocarbamate de zinc, du TPBP, de la capsaïcine, de l'econea, de la médétomidine, du zineb... (Thomas, 2001 ; Thomas & Brooks, 2009).

Les revêtements à base de biocides peuvent être classés en deux groupes de peintures dont les peintures AF classiques et les SPC.

2.3.1.1.1. Peintures AF classiques

Dans les peintures AF classiques, les biocides tels que l'oxyde de plomb, l'arsenic, le mercure et le cuivre sont incorporés dans une matrice, généralement une résine. La résine est soluble dans l'eau et est présente à la surface du revêtement. L'inconvénient avec ce type de revêtement est que seule une fine couche de peinture est active ; ce qui entraîne un taux élevé de lessivage et une chute rapide de la concentration de biocides en dessous du seuil d'efficacité. En plus, la durée de vie est courte, entre 6 et 12 mois (Terlizzi *et al.*, 2001).

Il existe un autre type de peinture à plus longue durée de vie (entre 18 et 24 mois) et dont la matrice polymère est insoluble dans l'eau. Les substances toxiques (oxyde de cuivre

ou composés organostanniques) diffusent à l'interface peinture-eau à travers des canaux présents dans la matrice. Au-delà de 24 mois d'utilisation, le taux de lessivage ainsi que la vitesse de diffusion sont fortement réduits, à raison de l'altération des canaux (Terlizzi *et al.*, 2001).

2.3.1.1.2. *Peintures AF auto polissante (SPC)*

Dans les SPC, le biocide (pour la plupart du temps le TBT) lié à la matrice polymère est libéré par hydrolyse à la surface de la peinture. La vitesse de libération du biocide est constante et contrôlée selon le mouvement de l'eau. Les couches de matrices microscopiques sont constamment emportées lorsque le navire est en mouvement et de nouvelles couches actives deviennent disponibles avec un effet de lissage. La durée de vie des SPC est plus longue, soit environ 4 à 5 ans (Terlizzi *et al.*, 2001).

2.3.1.2. *Revêtements à base d'enzymes*

Les enzymes sont des protéines à activité catalytique, omniprésentes dans la nature. Leur utilisation dans les revêtements AF remonte aux années 1980 et a connu une ampleur ces dernières années (Lejars *et al.*, 2012; Olsen *et al.*, 2007). Selon (Kristensen *et al.*, 2008), les enzymes peuvent affecter l'adhésion et la colonisation des microorganismes de quatre façons différentes. Ainsi, elles peuvent (i) empêcher la colonisation des organismes adhésifs, (ii) dégrader l'EPS du biofilm formé par la prolifération des organismes établis, (iii) catalyser la libération des composés AF de la surface et (iv) gêner la communication intercellulaire pendant la colonisation d'une surface.

2.3.2. *Revêtements non toxiques*

La récente interdiction des biocides toxiques a suscité le développement de stratégies AF respectueuses de l'environnement et la recherche de composés antifouling non toxiques d'origine marine (Qian *et al.*, 2010).

2.3.2.1. *Conception de surfaces microtopographiques*

Une stratégie AF non toxique est la conception de surfaces microtopographiques, dans le but de perturber physiquement l'adhésion des organismes du microfouling (Lejars *et al.*, 2012). La conception des surfaces microtopographiques tient son origine de certains

organismes marins qui les utilisent dans leur défense contre la bioadhésion. En effet, il a été montré que les requins, les moules et les crabes possèdent des défenses AF naturelles qui seraient liées à leurs caractéristiques microtopographiques et un revêtement de la muqueuse, sécrété par les cellules épidermiques (Magin *et al.*, 2010).

2.3.2.2. *Fouling Release Coating (FRC)*

Les FRC sont des revêtements sans biocides, idéaux pour la succession des revêtements toxiques car ils possèdent une surface qui n'a pas besoin de 'poison' pour tenir éloigné les organismes du biofouling ainsi qu'une bonne propriété autonettoyante (Brady Jr, 2001; Lejars *et al.*, 2012). Il existe deux principaux types de formulation des peintures FRC. Il s'agit des revêtements à base de composés fluorés et les revêtements à base de silicone (Lejars *et al.*, 2012). L'efficacité des revêtements FRC est liée à leurs propriétés hydrophobes et leur faible énergie de surface qui limitent l'attachement des organismes adhérant à leur surface. Les organismes sont délogés par stress hydrodynamique dès que le navire se déplace au-delà d'une certaine vitesse ou par simple nettoyage mécanique (Brady 2005; Chambers *et al.*, 2006).

Les principaux inconvénients des FRC sont le coût élevé de la peinture autonettoyante. En plus, la propriété autonettoyante n'est efficace qu'à des vitesses supérieures à 8 nœuds. Outre les propriétés autonettoyantes, les FRC sont sensibles aux dommages mécaniques (Lejars *et al.*, 2012). Un autre inconvénient est que les peintures FRC sont efficaces surtout sur le macrofouling, mais pas sur le microfouling. D'où l'importance d'y incorporer des biocides respectueux de l'environnement pour cibler le microfouling.

Le Tableau 2 décrit les avantages et les inconvénients liés à l'utilisation des principaux types de peintures AF.

Tableau 2 Les principaux avantages et inconvénients des systèmes AF passés et présents
Adapté de (Dafforn *et al.*, 2011)

Système AF	Les principaux avantages	Les principaux inconvénients
Self Polishing Coating		
Revêtements SPC a base de TBT	Large spectre de biocides, plus efficace, longue durée de vie (environ 5 ans).	Impact sur des espèces non ciblées Risque pour la santé humaine, Reste intact des mois voire des années dans les sédiments en fonctions des conditions environnementales.
Revêtements SPC sans étain (booster biocides)	Efficace contre une gamme d'invertébrés, longue durée de vie (environ 5 ans).	Impact du cuivre et des boosters biocides sur les organismes non ciblés Persistance de Cu dans le milieu marin, Dépend du pH, de la salinité, des matières organiques dissoutes
Approches biomimétiques	Alternatives naturelles respectueuses de l'environnement.	Pas encore disponible dans le commerce. Difficile en approvisionnement de quantité suffisante de composés.
Fouling Realease Coating		
Fouling Release Coating (FRC)	Efficace pour réduire la force d'attachement de l'encrassement, ne lessive pas, toxicité faible ou nulle, longue durée de vie (environ 10 ans).	Coût élevé de la peinture autonettoyante Propriété autonettoyante efficace qu'à haute vitesse Sensible à des dommages mécaniques

2.3.3. *Approches biomimétiques*

Une nouvelle approche de stratégies AF consiste à isoler à partir d'organismes marins tels que bactéries, algues, éponges et autres invertébrés marins, des molécules AF respectueuses de l'environnement. Les organismes marins utilisent divers mécanismes pour protéger leur surface des salissures. Ces mécanismes sont à la fois physiques et chimiques (Steinberg *et al.*, 1997).

Le mécanisme AF chimique clef des organismes marins se traduit par la production de métabolites secondaires qui empêchent la colonisation par les organismes du biofouling (Chambers *et al.*, 2006). Le phylum étudié en tant que sources de composés naturels AF au cours des années comprend les éponges, les algues, les cnidaires (coraux), les échinodermes (oursins), les tuniciers (ascidies), les bryozoaires et les bactéries (Chambers *et al.*, 2006). Plusieurs composés chimiques ou biologiques produits par les microorganismes marins ont été décrits dans la littérature comme étant des inhibiteurs efficaces du biofouling marin. C'est l'exemple des exo polysaccharides produits par la souche marine *Deleya marina* ATCC 25374 qui est actif contre l'attachement des larves de la balane *Balanus amphitrite* (Maki *et al.*, 1988), ou encore des dérivés de glycérol isolés de l'algue brune marine *Dictyota* sp. qui ont montré une activité antifouling sur des bactéries marines (Othmani *et al.*, 2014) (Tableau 3). Les substances bioactives qui montrent un intérêt, peuvent être utilisées dans le développement des revêtements antisalissure (Dobretsov *et al.*, 2013).

2.3.3.1. *Activité AF des bactéries marines*

2.3.3.1.1. *Activité antimicrobienne*

Des études ont montré l'activité antimicrobienne de bactéries épibiontes ou épiphytes, isolées de la surface d'invertébrés marins et d'algues et ce, depuis la découverte en 1966 du premier antibiotique produit par la bactérie marine *Alteromonas* sp., isolée d'herbiers des caraïbes *Thalassia* sp. (Dobretsov *et al.*, 2006; Fenical, 1993). Plusieurs métabolites possédant des activités antibiotiques et antimicrobiennes ont été isolés de plusieurs espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* etc... Ces métabolites inhibent la croissance des bactéries Gram négatif comme positif (Fenical, 1993 ; Holmström & Kjelleberg, 1999).

2.3.3.1.2. *Activité anti larvaire*

Plusieurs bactéries marines ont démontré leur capacité à inhiber la fixation de larves d'invertébrés. C'est l'exemple des bactéries marines *Halomonas marina* et *Vibrio campbelli*, isolées de biofilms naturels qui inhibent l'attachement des larves de la balane *Balanus amphitrite* au stade cypris (Maki *et al.*, 1988). Une autre étude a montré que la souche *Pseudoalteromonas tunicata* NCIMB 8614 produit des composés extracellulaires qui inhibent la colonisation par les larves du trématode *Hydroïdes elegans* et de la balane *Balanus amphitrite* (Holmström *et al.*, 2002).

2.3.3.1.3. *Activité algicide*

Très peu d'études ont rapporté l'activité algicide des bactéries marines (Dobretsov *et al.*, 2006). Egan *et al.* en 2000 ont décrit plusieurs isolats proches de la souche *Pseudoalteromonas tunicata* comme possédant une activité algicide contre les spores des algues *Ulva lactuca* et *Polysiphonia* sp. (Egan *et al.*, 2000 ; Holmström & Kjelleberg, 1999). Aussi, une molécule isolée de la souche *Pseudomonas* sp. K44-1, le harmane, aurait montré une activité antagoniste contre plusieurs souches de cyanobactéries (Kodani *et al.*, 2002).

2.3.3.2. *Activité AF des cyanobactéries*

Les cyanobactéries sont des organismes capables de produire des substances chimiques qui facilitent leur agrégation pour la formation des biofilms mais aussi qui leur permettent de rivaliser avec d'autres organismes à la conquête de nutriments et d'espace. Elles sont reconnues pour être une source riche de métabolites secondaires à propriétés AF (Burja *et al.*, 2001). Un exemple de l'activité AF des cyanobactéries est celui de la cyanobactérie marine *Lyngbya majuscula*, provenant de Pulau Hantu (Singapour) qui inhibe la colonisation de la forme cypris de la balane *Amphibalanus amphitrite* (Tan & Pi Lee Goh, 2009).

2.3.3.3. *Activité AF des macroalgues et des éponges*

La recherche de nouveaux agents AF a été également orientée vers les macroalgues et les éponges marines. Dans la plupart des cas, les macroalgues sessiles sont exemptes d'organismes du fouling sur leur surface, compte tenu de la large gamme de composés bioactifs qu'elles produisent (Hellio *et al.*, 2001). Dans une étude réalisée par Hellio et collaborateurs en 2001, 20% des extraits de macroalgues marines récoltées sur les Côtes

Ouest de la France auraient montré un effet antibactérien sans effet toxique sur les larves d'huîtres et d'oursins (Hellio *et al.*, 2001). Une autre étude a montré que deux composés isolés de la surface la macroalgue brune *Dictyota* spp., notamment un monoacylglycérol (1-*O*-octadecenoylglycérol) et le sn-3-*O*-(géranylgéraniol) glycérol auraient un effet antiadhésif sur les bactéries adhérentes telles que *Pseudoalteromonas* sp. D41, *Paracoccus* sp. 4M6 et *Polaribacter* sp. TC5 (Othmani *et al.*, 2014). Aussi, l'extrait brut de la macroalgue brune *Halidarys siliquosa* ainsi que le composé majoritaire de cet extrait se sont montrés actifs contre la croissance des souches de bactéries *Cobetia marina* ATCC 25374, *Marinobacterium stanieri* ATCC 27130, *V. fischeri* ATCC 7744, *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393 (Culioli *et al.*, 2008).

Tout comme les macroalgues marines, les éponges sont réputées pour renfermer des molécules à activité AF. En 2002, (Tsoukatou *et al.*, 2002) ont mis en évidence l'activité AF de trois éponges méditerranéennes *Ircinia oros*, *Ircinia variabilis* et *Ircinia spinosula* sur des représentants des principaux groupes d'organismes du biofouling, dont les bactéries, les champignons, les diatomées, les macroalgues et les moules.

2.4. Inhibition des biofilms marins par des inhibiteurs du quorum sensing

Une nouvelle approche de lutte contre le biofilm voire le biofouling est l'inhibition du système de communication bactérien de type QS (De Nys *et al.*, 1995 ; Hentzer *et al.*, 2002 ; Lazar, 2011 ; Manefield *et al.*, 1999; Ramage *et al.*, 2002 ; Rasmussen *et al.*, 2005 ; Ren *et al.*, 2001). En effet, de nombreuses bactéries utilisent le QS pour moduler l'expression de certains gènes, notamment ceux impliqués dans la formation de biofilm. L'inhibition du QS des bactéries pourrait de ce fait être une des stratégies permettant de contrôler la formation de biofilms (Sauer *et al.*, 2002).

L'exemple d'inhibition du QS dans le but prévenir le biofilm, ultérieurement le biofouling le plus décrit est celui de l'algue rouge *Delisea pulchra* qui produit une furanone halogénée, qui interfère avec les signaux du QS de bactéries et inhibe ainsi leur biofilm (Bauer & Robinson, 2002 ; Manefield *et al.*, 1999; Maximilien *et al.*, 1998). Les chapitres ultérieurs détailleront les mécanismes du QS et les stratégies visant son inhibition.

Tableau 3 Quelques exemples de composés biomimétiques isolés d'organismes marins
Adapté de (Dobretsov *et al.*, 2013)

Organismes	Source	Composés inhibiteurs	Actifs contre	Références
Activité antimicrobienne de bactéries marines				
<i>Shewanella oneidensis</i> SCH0402	Eau de mer	Acide Cis-9 oléique	Bactéries de l'environnement	(Bhattarai <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudovibrio</i> sp. D323	<i>D. pulchra</i>	Acide tropodithiétique		(Penesyan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6	Eau de mer	Inconnu	Bactéries de l'environnement	(Dheilly <i>et al.</i> , 2010)
Activité antilarvaire des bactéries marines				
<i>Deleya marina</i> ATCC 25374	Eau de mer	Exo polysaccharides	Attachement de larves de <i>B. amphitrite</i>	(Maki <i>et al.</i> , 1988)
<i>P. citrea</i> NCIMB 1889 <i>P. ulvae</i>	<i>U. lactuca</i>	Inconnu	Fixation de <i>H. elegans</i> et <i>B. amphitrite</i>	(Holmström <i>et al.</i> , 2002)
<i>Vibrio</i> sp. AJ391203	Corail mou <i>Dendronephthya</i> sp.	Polysaccharides >100 kDa	Fixation de larves de <i>H. elegans</i> et <i>Bugula neritina</i>	(Dobretsov & Qian, 2004)
Activité algicide des bactéries marines				
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	Tunicier <i>Ciona intestinalis</i>	Pigment vert foncé	Spores d'algues <i>U. lactuca</i> et de <i>Polysiphonia</i> sp	(Egan <i>et al.</i> , 2002; Holmström <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. tunicata</i>	<i>Ulva australis</i>	Inconnu	Spores de <i>Polysiphonia</i> sp.	(Rao <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. tunicata</i> (J49q-3a, J38q-5a) <i>P. piscicida</i> (A23a-4a, et B39bio)	Eau de côtières danoises	Inconnu	Spores d' <i>Ulva</i> sp.	(Bernbom <i>et al.</i> , 2011)
Activité AF des cyanobactéries				
<i>Lyngbya majuscula</i>	Eau de mer	Polypeptides	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	(Tan & Pi Lee Goh, 2009).
<i>Kyrtuthrix maculans</i>	Côtes rocheuses	Maculalactone A	Balanes <i>Tetraclita japonica</i> ; <i>Ibla cumingii</i>	(Brown <i>et al.</i> , 2004)
<i>Nostoc commune</i>	Echantillons des eaux de Suisse	Comnostin B	Mollusques <i>Biomphalaria glabrata</i>	(Jaki <i>et al.</i> , 2000)
Activité AF des macroalgues et éponges				
Algue brune <i>Dictyota</i> spp.	Mer Méditerranée	Dérivés de glycérol	Bactéries marines	(Othmani <i>et al.</i> , 2014)
<i>Halidrys siliquosa</i>	Côtes Atlantiques	Mérotérpénoïdes	Bactéries marines et balanes	(Culioli <i>et al.</i> , 2008)
Eponges méditerranéennes <i>Ircinia</i>	Mer Méditerranée	Inconnu	Différents organismes du biofouling	(Tsoukatou <i>et al.</i> , 2002)

3. Quorum sensing

3.1. Origine et découverte

Les bactéries ont longtemps été considérées comme des organismes avec une faible capacité d'interagir entre elles. C'est seulement au début des années 1970 que cette notion a été contestée avec la découverte et la description d'un système de communication chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970 ; Nealson & Hastings, 1979; Raina *et al.*, 2009), actuellement connu sous le nom de *quorum sensing* (QS). Cette expression a été introduite la première fois par (Fuqua & Winans, 1994), qui ont découvert un système de régulation de type QS contrôlant le transfert conjugatif du plasmide Ti chez la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* en présence d'un métabolite produit par la tumeur de la plante cible.

3.2. Définition

Le QS est un mode de communication intra et inter espèces bactériennes qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées 'autoinducteurs', produites au cours de la croissance bactérienne. Lorsque la concentration des autoinducteurs atteint un seuil critique dans le milieu, ceux-ci pénètrent dans la cellule et interagissent avec un régulateur transcriptionnel qui permet l'expression de gènes spécifiques en réponse à la forte concentration de cet autoinducteur (Czajkowski & Jafra, 2009; Waters & Bassler, 2005).

3.3. Notion d'autoinducteurs

Les autoinducteurs sont de petites molécules de signal chimique, diffusibles et produites par les bactéries qui possèdent un système de régulation de type QS. Leur concentration externe augmente en fonction de la densité cellulaire. La concentration seuil des autoinducteurs est détectée comme un signal par les bactéries, qui en réponse expriment certains gènes et donc certains phénotypes ou comportements bactériens (Henke & Bassler, 2004). Ce système signal-réponse va permettre aux bactéries de synchroniser leur comportement et d'agir comme des organismes multicellulaires (Bassler, 1999 ; Waters & Bassler, 2005). La notion d'autoinducteur a été introduite la première fois par (Kaplan & Greenberg, 1985), dans le modèle de régulation de la luminescence chez *V. fischeri*. Les autoinducteurs sont généralement produits par une protéine homologue de LuxI de *V. fischeri*

(Salmond *et al.*, 1995). Les autoinducteurs du QS sont spécifiques au type de Gram des bactéries et à chaque espèce.

3.4. Mécanisme du QS chez les bactéries

Le système QS est rencontré à la fois chez les bactéries Gram négatif et positif (Parker & Sperandio, 2009). Chez les bactéries Gram négatif, il implique la sécrétion de petites molécules dérivées d'acides gras, alors que chez les bactéries Gram positif, il est basé sur la production de dérivés peptidiques (Czajkowski & Jafra, 2009). Chez les bactéries Gram négatif, en plus des dérivés d'acide gras, certains dipeptides telles que les dicétopipérazines (Campbell *et al.*, 2009; Holden *et al.*, 1999) et les quinolones (Pesci *et al.*, 1999b) ont été décrits comme étant des molécules du QS. Il existe un autre type de molécules du QS détecté aussi bien chez les bactéries Gram négatif que positif. Il s'agit l'AI-2 (Bassler, 2002).

Trois composants majeurs sont impliqués dans le mécanisme du QS chez les bactéries. Il s'agit de l'autoinducteur et d'un couple de protéines, dont une synthase et un récepteur (Waters & Bassler, 2005). Le QS est à l'origine de l'expression de plusieurs types de gènes en l'occurrence les gènes codant pour l'émission de la bioluminescence, la sporulation, la compétence, la production d'antibiotique, la sécrétion de facteurs de virulences, la production de pigments et la formation de biofilm (Rutherford & Bassler, 2012a).

3.4.1. QS chez les bactéries Gram négatif

3.4.1.1. Cas de *Vibrio fischeri*

Le premier système QS a été découvert et décrit par Nealson et collaborateurs en 1970, chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). *V. fischeri* est une bactérie marine qui vit en symbiose avec le calmar hawaïen *Euprymna scolopes* (Figures 7A et 7B). Le calmar ne possède pas de bactérie à la naissance. *V. fischeri* colonise l'organe de luminescence du calmar grâce à des pores qui s'y trouvent. Dans cet organe, *V. fischeri* croît à une forte densité (10^{10} - 10^{11} cellules/mL) (Schaefer *et al.*, 1996b), produit un signal diffusible qui s'accumule et induit l'expression des gènes nécessaires à l'émission de la bioluminescence.

Tous les jours à l'aube, le calmar expulse environ 90 à 95% de bactéries. Pendant les 4 à 6h qui suivent, les bactéries restantes prolifèrent pour restaurer une quantité bactérienne physiologiquement apte à émettre de la luminescence (Nealson & Hastings, 1979). Le calmar

utilise la lumière émise par la bactérie comme contre-éclairage pour masquer son ombre, afin d'éviter les prédateurs. En retour, la bactérie bénéficie d'un environnement plus riche en nutriments au sein de l'organe du calmar, afin de pouvoir proliférer (Visick *et al.*, 2000). Des relations symbiotiques similaires existent entre *V. fischeri* et le poisson pomme de pin *Monocentris japonica* (Figures 7B et 7C).

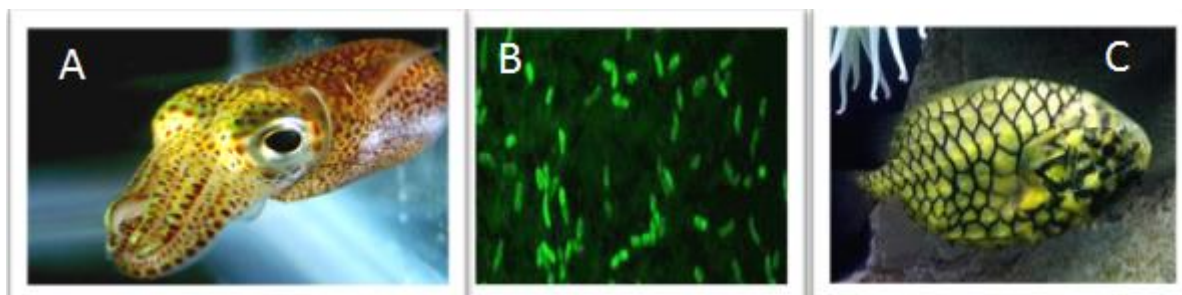


Figure 7 Exemple de bioluminescence symbiotique.

Entre: (A) le calmar de l'océan pacifique *Euprymna scolopes* (B) *V. fischeri* et (C) le poisson pomme de pin *Monocentris japonica*.

Chez *V. fischeri*, le QS implique un couple de protéines appelées LuxI-LuxR. LuxI est la protéine qui synthétise l'autoinducteur de *Vibrio* ; la 3-oxo-hexanoyl-*L*-homosérine lactone (3-oxo-C₆-HSL) (Eberhard *et al.*, 1981). La 3-oxo-C₆-HSL diffuse passivement à travers la membrane cellulaire des bactéries. Lorsque sa concentration atteint un seuil critique à l'extérieur de la cellule, soit à forte densité cellulaire (environ 10¹¹ cellules/mL), elle pénètre dans la cellule, se fixe à la protéine réceptrice LuxR. Le complexe 3-oxo-C₆-HSL-LuxR se fixe à son tour au promoteur d'un groupe de gènes appelé *lux*-boxes (*luxCDABE*) qui codent pour la bioluminescence, pour en réguler leur transcription (Kaplan & Greenberg, 1985) (Figure 8).

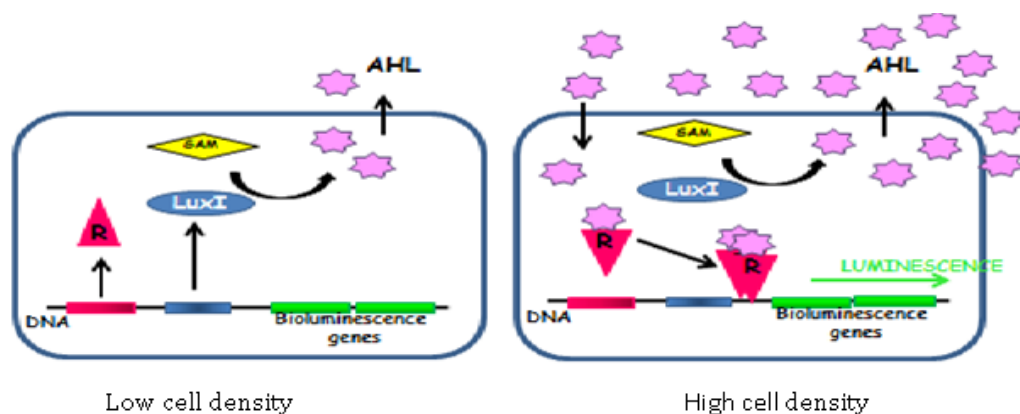


Figure 8 Mécanisme du QS chez *V. fischeri*
Adapté de (Czajkowski & Jafra, 2009).

3.4.1.2. Cas général des bactéries Gram négatif

Le système QS décrit chez *V. fischeri*, basé sur l'émission de la bioluminescence est considéré comme le paradigme du QS chez la plupart des bactéries Gram négatif (Nealson & Hastings, 1979). Le mécanisme QS le plus décrit est celui des bactéries Gram négatif. Il implique la production et la réponse à de petites molécules inductrices appartenant à la famille des AHLs (Czajkowski & Jafra, 2009; Fuqua & Greenberg 2002 ; Fuqua *et al.*, 1994) (Figure 9).

Les AHLs sont synthétisées par une protéine homologue de LuxI et sortent des cellules par simple diffusion pour les courtes chaînes d'AHLs ou par transport actif pour les longues chaînes. Lorsque leur concentration atteint un seuil critique, elles entrent dans les cellules et se fixent à un récepteur homologue de LuxR. Le complexe AHL-LuxR active la transcription de gènes spécifiques (Fuqua *et al.*, 1994). Selon certains auteurs, il existerait une grande spécificité entre les récepteurs et leurs AHLs apparentées (Bassler, 2002 ; Waters & Bassler, 2005). En absence d'AHL, le récepteur de type LuxR se dégrade rapidement. Inversement, la fixation de l'AHL au récepteur stabilise celui-ci contre la protéolyse (Dobretsov *et al.*, 2009 ; Zhu & Winans, 2001).

Un grand nombre de bactéries Gram négatif possède des protéines de type LuxI-LuxR et de ce fait, communique avec des signaux AHLs. C'est l'exemple, de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas aureofaciens*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia stewartii*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia liquefaciens*, *Yersinia enterocolitica*, *Chromobacterium violaceum*... (Salmond *et al.*, 1995 ; Whitehead *et al.*, 2001; Winson *et al.*, 1995). Ainsi, nombres de phénotypes sont régulés par le QS (voir Tableau 4).

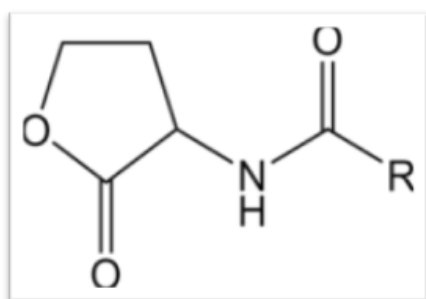


Figure 9 Structure générale d'une AHL.

3.4.2. QS chez les bactéries Gram positif

Les bactéries Gram positif utilisent des dérivés peptidiques comme signaux de communication. Le signal peptidique est produit par une protéine précurseur et est excrété en dehors de la cellule par transport actif. Lorsque sa concentration extracellulaire atteint un niveau de stimulation minimale, le signal peptidique est détecté par deux composants membranaires histidine kinases qui jouent le rôle de récepteurs (Kleerebezem *et al.*, 1997; Miller & Bassler, 2001 ; Waters & Bassler, 2005). L'interaction du récepteur avec le ligand peptidique initie une cascade de phosphorylation qui aboutit à celle de la protéine régulatrice. La série de phosphorylation active donc un récepteur qui vient se fixer à l'ADN et régule ainsi la transcription des gènes cibles (Lazazzera & Grossman, 1998 ; Miller & Bassler, 2001). Tout comme chez les bactéries Gram négatif, ce type de système QS est aussi régulé de façon dépendante de la densité cellulaire (Kleerebezem *et al.*, 1997).

L'un des systèmes de régulation à base de peptides parmi les plus décrits est le système *Agr* chez *S. aureus* qui utilise une stratégie à deux phases pour déclencher une infection chez l'homme. En effet, à faible densité cellulaire, la bactérie se contente de sécréter des facteurs protéiques qui favorisent l'attachement et la colonisation des surfaces. Lorsque sa densité cellulaire est élevée, elle réprime la sécrétion des facteurs protéiques et se lance dans la sécrétion de protéases et de toxines qui sont sans doute nécessaires à l'établissement de l'infection (Lyon & Novick, 2004). Des systèmes de régulation similaires, basés sur l'utilisation de peptides ont été décrits chez plusieurs bactéries Gram positif. Ainsi, le développement de la compétence génétique chez *B. subtilis* et *Streptococcus pneumoniae*, le transfert de plasmides de conjugaison chez *Enterococcus faecalis* ainsi que la production de peptides antimicrobiens chez plusieurs différentes espèces de bactéries Gram positif sont régulés par des peptides phéromones (Fuqua & Greenberg 2002 ; Kleerebezem *et al.*, 1997; Lazazzera *et al.*, 1997).

3.5. Différents types de molécules inductrices du QS

Bien que plusieurs systèmes de régulation de type QS impliquant diverses molécules signalétiques ont été identifiés à ce jour, les plus connues sont les acyl homosérine lactones chez les bactéries Gram négatif et la signalisation à base de peptides, rencontrés chez plusieurs espèces Gram positif. Il existe cependant un troisième système de signalisation retrouvé aussi bien chez les espèces Gram négatif que positif. Il s'agit du système de

signalisation AI-2 (Parsek & Greenberg, 2005). De plus, un autre type de signal dénommé AI-3, a été décrit chez les bactéries pathogènes entériques telles que *E. coli* et *Salmonella thyphimurium* (Kendall & Sperandio, 2007; LaSarre & Federle, 2013).

3.5.1. *Acyl Homosérine Lactones (AHLs)*

Les AHLs sont de petites molécules chimiques composées d'un groupement lactone et d'une chaîne acyle latérale, qui varie selon la longueur et selon la présence ou non d'un groupement substitué (oxo ou hydroxy), sur le carbone en position 3 (Czajkowski & Jafra, 2009) (Figure 10). Elles sont synthétisées par des protéines synthases, qui sont des enzymes appartenant à la famille des protéines de type LuxI (Salmond *et al.*, 1995).

Le nombre de carbone de la chaîne acyle des AHLs synthétisées naturellement peut, varier de 4 à 18. Selon (Waters & Bassler, 2005), ces différences seraient cruciales pour la spécificité de la signalisation.

Il existe aussi un autre niveau de différence dans la structure des AHLs qui se situe dans le degré d'activité des isomères des AHLs. En effet, certains isomères d'AHLs seraient plus ou moins actifs par rapport à d'autres. McClean et collaborateurs en 1997 ont montré que l'isomère (D) de la 3-oxo-C₆-HSL était 60 fois moins actif que l'isomère (L). Dans tous les cas, le cycle lactone est conservé dans tous les signaux AHLs identifiés à ce jour.

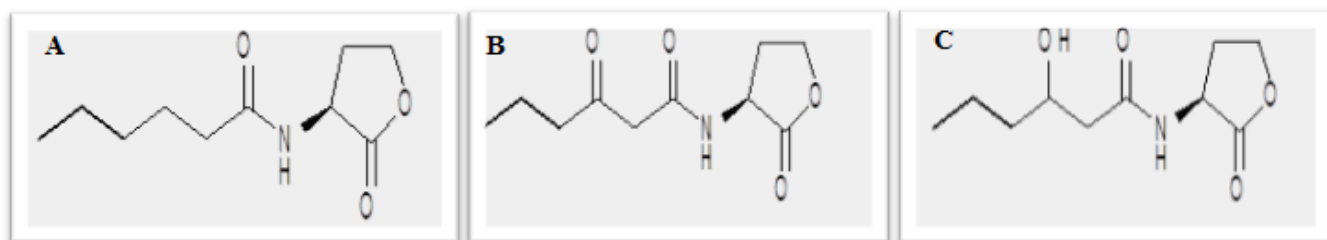


Figure 10 Différentes structures d'AHLs (cas à six carbones).

(A) Chaîne latérale non substituée (C₆-HSL) (B) Chaîne latérale substituée avec un groupement oxo sur le carbone en position 3 (3-oxo-C₆-HSL) (C) Chaîne latérale substituée avec un groupement hydroxy sur le carbone en position 3 (3-OH-C₆-HSL).

3.5.2. *Peptides*

Les oligopeptides sont des molécules de signalisation de cellule à cellule, couramment rencontrées chez les bactéries Gram positif. Ce sont des molécules intracellulaires qui interagissent avec des récepteurs membranaires, afin d'éviter la dégradation par des peptidases intracellulaires. Contrairement aux AHLs, les peptides ne sont pas diffusibles à travers la membrane, d'où la nécessité d'un transport actif par des transporteurs spécialisés d'oligopeptides situés sur la membrane cellulaire (Sturme *et al.*, 2002). Tout comme dans le cas des AHLs, la signalisation par les peptides est dépendante de la densité cellulaire. En plus, les peptides possèderaient également une spécificité pour un récepteur donné (Lazazzera & Grossman, 1998 ; Waters & Bassler, 2005).

3.5.3. *Autres signaux*

Un troisième signal de communication inter-bactéries tout aussi connu que les AHLs et les peptides a récemment été identifié. Il s'agit de l'AI-2 considéré comme le signal universel de la communication inter bactérienne (Chen *et al.*, 2002 ; Waters & Bassler, 2005), pour avoir été identifié aussi bien chez les bactéries Gram négatif comme positif. Il a été décrit pour la première fois chez *Vibrio harveyi*, chez qui il contrôle la synthèse de la bioluminescence (Bassler *et al.*, 1994). *V. harveyi* produit deux autoinducteurs nommés HAI-1 et AI-2. Le premier signal, HAI-1 est une AHL, bien qu'il ait été montré que sa synthèse ne dépend pas de l'enzyme type LuxI. Il s'agit de la 3-OH-C₄-HSL. Le second autoinducteur, AI-2 est un furanosyl-borate diester (Bassler, 2002).

La synthèse de l'AI-2 est dirigée par le produit du gène *luxS* qui est largement conservé chez les bactéries Gram négatif et positif (Chen *et al.*, 2002). De nombreuses espèces se sont révélées posséder un homologue du gène *luxS*, bien que le mécanisme de signalisation n'ait pas été complètement défini dans la plupart de ces systèmes (Parsek & Greenberg, 2005). C'est le cas des bactéries entériques *E. coli* et *Salmonella*, qui utilisent l'AI-2 plutôt que les AHLs (Bauer *et al.*, 2005). Le récepteur impliqué dans ce type de signalisation chez les bactéries Gram négatif est LuxP, qui appartient à la grande famille des protéines périplasmiques, qui se lie à divers ligands (Chen *et al.*, 2002).

D'autres types de signalisation, entrant dans le système QS ont été identifiés à nos jours, aussi bien chez les bactéries Gram négatif que celles Gram positif. Il s'agit des quinolones identifiés à ce jour chez *P. aeruginosa* (Pesci *et al.*, 1999b), de l'AI-3 décrit chez

les bactéries pathogènes entériques (LaSarre & Federle, 2013), des dicétopipérazines isolées chez plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* telles que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas. alcaligenes* ainsi que d'autres bactéries comme *Proteus mirabilis*, *E. agglomerans*, *Vibrio vulnificus* (Campbell *et al.*, 2009)...

3.6. Les protéines de famille *LuxI* et *LuxR*

La découverte selon laquelle les AHLs sont produites par plusieurs bactéries suggère que ces bactéries pourraient contenir des protéines homologues de *LuxI* et *LuxR*. En fonction du groupe de bactéries, il peut exister une homologie ou une différence dans la structure moléculaire de ces deux protéines. A ce jour, il a été démontré que les homologues de *LuxI* des entérobactéries sont peu distincts de ceux des non-entérobactéries. Cependant, il n'y a pas de différences évidentes entre les membres de la famille des homologues de *LuxR* (Salmond *et al.*, 1995).

3.6.1. Famille de protéines de type *LuxI*

Les protéines de type *LuxI* sont des enzymes qui catalysent la biosynthèse des AHLs à partir de deux substrats qui sont la S-adénosylméthionine (SAM) et la protéine transporteuse de groupement acyle (acyle-ACP). La réaction commence par la formation d'une liaison amide entre la chaîne latérale acyle de l'acyle-ACP et le groupement amine du fragment homocystéine de la SAM (1), suivie de la lactonisation de l'intermédiaire ligaturé de la SAM et la libération de la méthylthioadénosine (2) (Miller & Bassler, 2001) (Figure 11). Plusieurs études ont montré l'implication d'homologues de *LuxI* dans la biosynthèse de différentes AHLs. Il est cité en exemple *LuxI* chez *V. fischeri*, impliqué dans la synthèse de la 3-oxo-C₆-HSL (Hanzelka & Greenberg, 1996 ; Schaefer *et al.*, 1996b), *RhlI* et *LasI* chez *P. aeruginosa*, qui sont respectivement impliqués dans la synthèse de la C₄-HSL et de la 3-oxo-C₁₂-HSL (Parsek *et al.*, 1999 ; Pesci & Iglewski, 1997) et *TraI* chez *A. tumefaciens*, impliqué dans la synthèse de la 3-oxo-C₈-HSL (Moré *et al.*, 1996)... Ces auteurs ont convenu que la synthèse des AHLs était plus efficace (environ 9 fois) quand l'acyle-ACP était le substrat, par rapport à l'acyle-coenzyme A.

Les protéines de type *LuxI* sont en général longues d'environ 190 à 230 acides aminés et partagent une identité de 30 à 35% de paires de bases. Chez la plupart d'entre-elles, dix résidus conservés se regroupent au niveau de l'acide aminé 110 dans l'extrémité *N*-terminale (Fuqua & Greenberg 2002). Ils dirigent l'aspect commun du mécanisme enzymatique, c'est-à-

dire la reconnaissance de la SAM et l'ACP (Fuqua & Greenberg 2002). Sept d'entre eux portent des chaînes latérales chargées et sont absolument nécessaires pour diriger la réaction, car leur mutation empêche totalement la catalyse de la réaction. Une mutation au niveau des trois autres résidus réduit l'efficacité de la réaction ; ce qui montre bien qu'ils jouent un rôle moins essentiel par rapport aux sept premiers (Parsek *et al.*, 1997). Chaque protéine LuxI produit le signal correct avec une grande fidélité. Il existe cependant certaines protéines LuxI qui produisent plusieurs AHLs, même s'il n'est pas prouvé qu'elles soient toutes biologiquement actives (McClean *et al.*, 1997). Il n'existe pas de corrélation simple entre l'AHL synthétisée et le degré d'identité de séquence entre les différentes protéines de type LuxI.

Selon qu'une même molécule AHL soit produite de façon majoritaire ou minoritaire par différentes bactéries, elle est synthétisée par différentes protéines homologues de LuxI. En effet selon McClean et collaborateurs en 1997, les genres *Agrobacterium*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Photobacterium* qui produisent de façon minoritaire la C₆-HSL, ont toutes un homologue de LuxI différent de celui de *C. violaceum* qui la produit de façon prédominante.

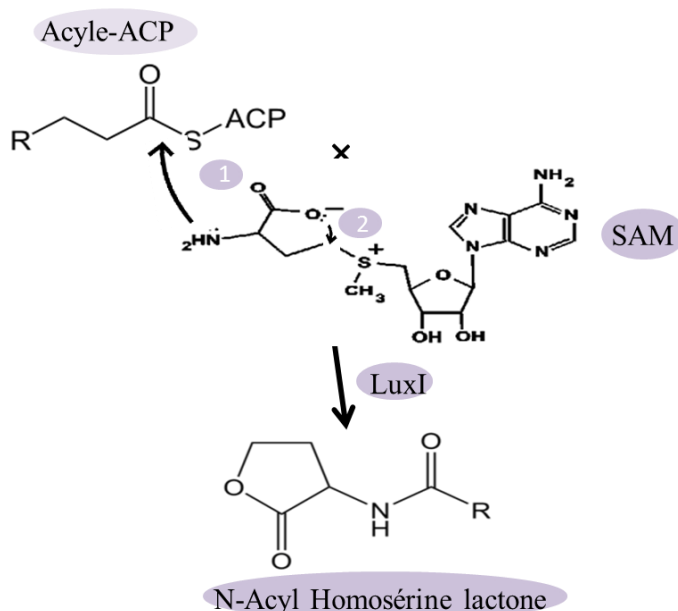


Figure 11 Schéma général de la biosynthèse d'AHL par une protéine homologue de LuxI.
(1) Liaison amide entre la chaîne latérale acyle de l'acyle-ACP et le groupement amine de la SAM (2) lactonisation de l'intermédiaire ligaturée de la SAM et libération de la méthylthioadénosine. Schéma adapté de (Lazazzera & Grossman, 1998 ; Miller & Bassler, 2001).

3.6.2. Famille de protéines de type LuxR

LuxR est une protéine essentiellement cytoplasmique, cependant il arrive parfois qu'elle présente un caractère 'faiblement membranaire', associée à d'autres protéines (protéines membranaires périphériques) (Salmond *et al.*, 1995). Elle est constituée de deux domaines. Le domaine N-terminal, impliqué dans la liaison de l'AHL et le domaine C-terminal, qui est nécessaire à la fixation à l'ADN et à l'activation de la transcription (Choi & Greenberg, 1991). Tous les homologues fonctionnels de LuxR possèdent un motif "helix-turn-helix" au niveau de leur extrémité carboxyle qui est nécessaire pour la liaison à l'ADN. Chez *V. fischeri*, la poche de liaison des AHLs forme une sorte de sandwich α - β - α qui coordonne l'interaction avec le ligand. En absence de fixation d'autoinducteur à l'extrémité N-terminal de la protéine, celui-ci inhibe immédiatement la liaison de l'ADN par le domaine C-terminal (Stevens *et al.*, 1994). Cette observation a été aussi effectuée pour la protéine TraR d'*A. tumefaciens*. En effet, en absence de l'autoinducteur 3-oxo-C₈-HSL, TraR est insoluble et est sujet à la protéolyse, cependant en présence de la 3-oxo-C₈-HSL, TraR est soluble et stable (Zhu & Winans, 2001).

La majeure partie des protéines membres de la famille de LuxR fonctionnent en tant qu'activateurs transcriptionnels des AHLs. Il existe cependant une sous famille de récepteurs qui semble fonctionner comme des répresseurs transcriptionnels (Fuqua & Greenberg 2002). Le principe de la répression transcriptionnelle est similaire à celui des activateurs. Il consiste en une accumulation d'AHLs et à l'expression des gènes cibles, sauf que cette fois ci, le mécanisme est différent. En effet, en l'absence de l'AHL, le récepteur se lie à l'ADN et les gènes sont transcrits. En présence de l'AHL, le récepteur est dissocié de l'ADN et la transcription des gènes cibles est réprimée (Fuqua & Greenberg 2002). C'est l'exemple la bactérie *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, chez qui le récepteur EsaR agit en tant que répresseur de la synthèse d'exopolysaccharides en présence de la 3-oxo-C₆-HSL (Minogue *et al.*, 2002; von Bodman *et al.*, 1998). Des répresseurs transcriptionnels auraient aussi été identifiés chez *Erwinia carotovora* (Andersson *et al.*, 2000).

3.7. QS chez *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie qui est retrouvée dans l'eau et dans le sol. C'est un pathogène opportuniste de l'homme, des animaux et des plantes. L'une des raisons de sa pathogénicité est qu'elle produit de nombreux facteurs de virulence tels que les exoprotéases, des lipases et des sidérophores. Chez *P. aeruginosa*, plusieurs facteurs de

virulence sont contrôlés par le QS (Parsek & Greenberg, 2000). En effet, selon Bauer et collaborateurs en 2005, le nombre de gènes et de protéines sous la régulation du QS chez *P. aeruginosa* serait estimé entre 5 et 20%. Ces différents facteurs extracellulaires sont produits après qu'une population critique de bactéries soit atteinte.

Deux systèmes de régulation de type QS ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Il s'agit du système LasI/3-oxo-C₁₂-HSL/LasR et du système RhII/C₄-HSL/RhlR (Davies *et al.*, 1998). LasI produit la 3-oxo-C₁₂-HSL. LasR est le régulateur transcriptionnel qui nécessite un niveau suffisant de la 3-oxo-C₁₂-HSL pour activer un certain nombre de gènes de virulence, dont *lasB*, *toxA*, *lasI*, *rhlI* et *rhlR* (Pearson *et al.*, 1994 ; Seed *et al.*, 1995). Le gène *lasB* coderait pour l'élastase (Pearson *et al.*, 1997). Ces différents gènes cibles seraient activés par différentes concentrations de 3-oxo-C₁₂-HSL (Seed *et al.*, 1995). RhII dirige la synthèse de la C₄-HSL, tandis que RhlR est le régulateur transcriptionnel qui se lie à la C₄-HSL pour activer l'expression d'une seconde classe de gènes tels que le gène *rpoS*, impliqué dans la production en phase stationnaire du facteur sigma σ (Pesci & Iglewski, 1997 ; Whiteley *et al.*, 1999), la pyocyanine, les rhamnolipides, l'élastase et les protéases LaSA (Brint & Ohman, 1995; Pesci & Iglewski, 1997). L'induction de la transcription de *lasI* par LasR induit une boucle d'autorégulation positive. Celle de *rhlI* et *rhlR* par LasR signifierait que le système *rhl* nécessite un système *las* déjà actif (Pesci & Iglewski, 1997) (Figure 12).

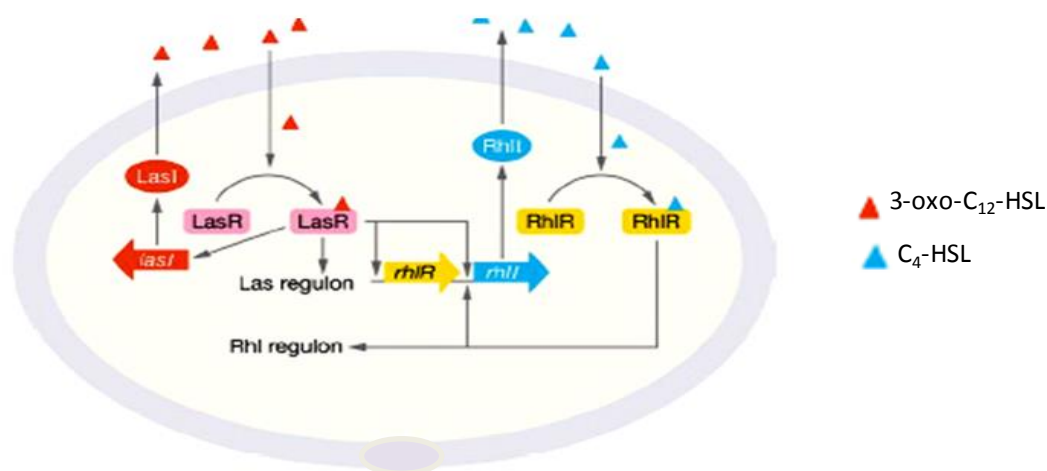


Figure 12 Système QS chez *P. aeruginosa* (Waters & Bassler, 2005).

Plusieurs espèces de bactéries ont été identifiées comme possédant un système QS, à travers les différents types de signaux. Nous pouvons citer entre autres, *V. fischeri*, *P. aeruginosa*, *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *V. harveyi* (Miller & Bassler, 2001)... Le Tableau 4 résume des phénotypes contrôlés par le QS à travers les différents types de signaux qui peuvent exister.

Tableau 4 Phénotypes sous contrôle du QS chez les bactéries marines et pathogènes.

Signaux QS	Homologues LuxI/LuxR	Bactéries	Processus contrôlé par le QS	Références
AHLs				
3-oxo-C₆-HSL	LuxI/LuxR	<i>V. fischeri</i> MJ-1	Bioluminescence	(Eberhard <i>et al.</i> , 1981)
3-OH-C₄-HSL (HAI-1)	LuxM	<i>V. harveyi</i> MAV	Bioluminescence	(Cao & Meighen, 1989) ; (Waters & Bassler, 2005)
3-oxo-C₁₀-HSL	VanI/VanR	<i>V. anguillarum</i> NB10	Virulence	(Milton <i>et al.</i> , 1997)
C₄-HSL	RhII/RhIR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Virulence	(Pearson <i>et al.</i> , 1994), (Pearson <i>et al.</i> , 1997)
3-oxo-C₆-HSL	ExpI/ExpR	<i>E. carotovora</i> SCC3193	Virulence, production d'exoenzymes	(Pirhonen <i>et al.</i> , 1993)
3-oxo-C₁₂-HSL	LasI/LasR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Virulence	(Davies <i>et al.</i> , 1998)
3-oxo-C₈-HSL	TraI/traR	<i>A. tumefaciens</i> R10	Transfert conjugatif	(Fuqua & Winans, 1994)
C₄-HSL, (C₆-HSL)	AhyI/AhyR AsaI/AsaR	<i>A. hydrophila</i> A1 <i>A. salmonicida</i> MT1326	Biofilm et exoprotéases	(Swift <i>et al.</i> , 1999) ; (Swift <i>et al.</i> , 1997)
C₆-HSL	CviI/CviR	<i>C. violaceum</i> 12472 ou 31532	Production de violacéine et enzyme	(McLean <i>et al.</i> , 2004), (McClean <i>et al.</i> , 1997)
C₄-HSL	SwrI/SwrR	<i>S. marcescens</i> MG1	Swarming	(Labbate <i>et al.</i> , 2004)
C₆-HSL; 3 oxo-C₆-HSL; C₈-HSL	YenI/YenR YpsI/YpsR	<i>Y. enterocolytica</i> 90/54 ; <i>Y. pseudotuberculosis</i> III (pIB1)	Motilité, Agrégation	(Atkinson <i>et al.</i> , 2006) ;
Oligopeptides				
AIP groupes (I, II, III et IV)	<i>AgrBDCA</i>	<i>S. aureus</i> RN6911	Virulence	(Lyon & Novick, 2004), (Dufour <i>et al.</i> , 2002)
ComX et CSF		<i>B. subtilis</i>	Compétence, sporulation	(Waters & Bassler, 2005)
DKPs	Inconnu	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Communication inter-espèces	(Holden <i>et al.</i> , 1999)
AI-2				
Diester de furanosyl borate (AI-2)	LuxS/LuxP	<i>V. harveyi</i> BB170	Luminescence Virulence	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
Cholera autoinducteur 1 CAI-1	CqSA	<i>V. cholerae</i> El Tor C6706str2	Virulence	(Miller <i>et al.</i> , 2002), (Kelly <i>et al.</i> , 2009)
Autres				
γ-butyrolactones	Facteur-A (ArpA)	<i>Streptomyces griseus</i>	Biosynthèse d'ATB	(Waters & Bassler, 2005), (Chater & Horinouchi, 2003)

3.8. Bactéries biosenseurs

Certaines bactéries permettent la détection phénotypique d'un système QS actif. Ces bactéries sont appelées biosenseurs, car elles permettent une détection sensible et quantitative des signaux du QS tels que les AHLs. Parmi les biosenseurs, il existe des bactéries pour lesquelles le phénotype détectable est naturellement présent et est connu pour être sous la dépendance du QS. C'est le cas de la production de violacéine chez *C. violaceum* ATCC 12472 et l'émission de la bioluminescence chez *V. fischeri* ES114. Ces souches bactériennes sont donc utilisées comme biosenseurs pour la détection de la C₆-HSL et de la 3-oxo-C₆-HSL. Il existe aussi des bactéries chez lesquelles il a été inclut un système rapporteur, afin d'y introduire un phénotype détectable de manière artificielle. Il s'agit de la production de la β -galactosidase chez différentes souches telles qu'*E. coli* XL1-Blue et MG4, *A. tumefaciens* NT1, A136 et KYC55, grâce à l'introduction du gène *lacZ* (Cha *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2003). Il s'agit également de l'émission de la bioluminescence, grâce à l'introduction de l'opéron *luxCDABE* chez diverses souches d'*E. coli* (Pearson *et al.*, 1994; Swift *et al.*, 1997 ; Winson *et al.*, 1998) et de la production de la fluorescence verte, grâce au gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) (Andersen *et al.*, 2001; Steindler & Venturi, 2007). D'autres biosenseurs sont construits à partir de mutation effectuée chez la souche sauvage. C'est le cas de la mutation par insertion d'un mini-transposon Tn5 chez *C. violaceum* CV026 qui implique la non production d'AHLs et qui de ce fait favorise la détection d'AHLs exogènes chez cette dernière (McClean *et al.*, 1997) (Tableau 5 et Figure 13).

De façon générale, les biosenseurs ne possèdent pas d'AHLs synthase, de sorte à ce que l'activité du gène rapporteur nécessite l'apport d'AHLs exogènes. Les biosenseurs communément utilisés pour la détection de la production d'AHLs sont pour la plupart des souches qui ne produisent pas d'AHLs, pour avoir subi une mutation dans le gène homologue de *luxI*. Les biosenseurs sont donc des bactéries modèles, pouvant percevoir des molécules exogènes et émettre un signal visible, mesurable et quantifiable (émission de bioluminescence, production de violacéine, production de la β -galactosidase...) (Steindler & Venturi, 2007). Un grand nombre de molécules AHLs ont été détectées grâce à divers biosenseurs, impliquant différents gènes rapporteurs (Farrand *et al.*, 2002). Ils appartiennent généralement aux espèces *A. tumefaciens*, *C. violaceum*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ce sont des biosenseurs classiques qui pour la plupart ne détectent pas les AHLs longues de plus de 14

atomes de carbones. Pourtant, certaines espèces bactériennes appartenant aux α -protéobactéries, notamment *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhizobium leguminosarum* et *Sinorhizobium meliloti* sont capables de produire des AHLs à plus de 14 atomes de carbones, qui ne sont pas reconnues par les biosenseurs classiques (Llamas *et al.*, 2004). Ceci représente donc une des limites des biosenseurs impliquant l'utilisation d'autres approches pour la détection des AHLs à longues chaînes latérales. Une autre limitation dans l'utilisation des biosenseurs est qu'ils ne détectent qu'une gamme très étroite d'AHLs. Par exemple, *C. violaceum* ne peut détecter aucun des dérivés 3-hydroxy-AHLs et manque de sensibilité pour la plupart des dérivés 3-oxo-AHLs (McClean *et al.*, 1997). De plus, leur activité peut être affectée par le métabolisme global des cellules (Defoirdt *et al.*, 2013a).

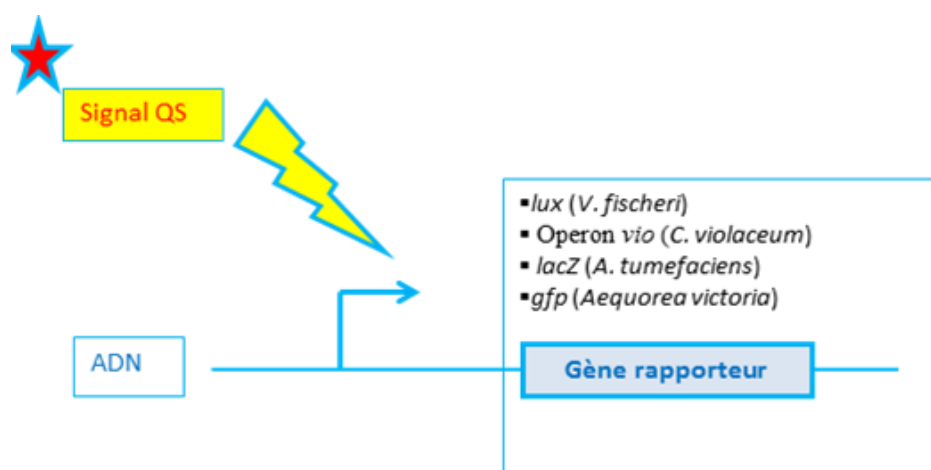


Figure 13 Schéma général de l'utilisation des biosenseurs.

Utilisation des biosenseurs grâce à leur(s) gène(s) rapporteur(s) naturel(s) ou artificiel (s) pour l'induction du QS.

3.8.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie tellurique à Gram négatif, pathogène opportuniste des plantes. Il est l'agent causal de la tumeur de la galle du collet chez certains végétaux supérieurs, à travers la transmission de son plasmide oncogénique Ti (*tumor-inducing*), dans le noyau des plantes infectées (Figure 14A). Le transfert conjugatif du plasmide Ti se fait sous le contrôle du QS à travers les gènes de régulation *traI/traR* qui sont situés sur le plasmide transmissible (Fuqua *et al.*, 1994 ; Piper *et al.*, 1993). La conjugaison entre bactéries nécessite deux principaux signaux dont l'opine, provenant de l'hôte et une AHL, la 3-oxo-C₈-HSL qui est le produit de l'enzyme TraI (Zhu *et al.*, 1998). L'opine

produite chez l'hôte infectée agit à la fois comme source de croissance pour la bactérie et initie par la même occasion le QS par activation de l'expression du récepteur TraR, à travers l'activateur OccR (Fuqua & Winans, 1996) ou à travers le répresseur AccR (Beck von Bodman *et al.*, 1992). Une fois la protéine TraR exprimée, le complexe TraR/3-oxo-C₈-HSL active l'expression des gènes de l'opéron *tra* (*tra* boxes), y compris *traI* de façon dépendante de la densité cellulaire (Fuqua & Winans, 1996). Plusieurs biosenseurs ont été construits en utilisant le gène rapporteur *lacZ*. C'est le cas d'*A. tumefaciens*, avec les souches *A. tumefaciens* NT1, *A. tumefaciens* A136 et *A. tumefaciens* KYC55. Ces biosenseurs proviennent d'une mutation dans le gène *traI* de la souche sauvage *A. tumefaciens* R10. Ils permettent la détection d'un large éventail d'AHLs (Steindler & Venturi, 2007; Zhu *et al.*, 2003).

La souche *A. tumefaciens* KYC6, mutante de la souche sauvage R10 par insertion du transposon Tn5 au niveau du plasmide Ti (Fuqua & Winans, 1994), est utilisée comme contrôle positif de production d'AHLs dans les bio-essais avec les biosenseurs construits d'*Agrobacterium*. Elle produit la 3-oxo-C₈-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL et en moindre quantité la C₆-HSL (Zhu *et al.*, 1998).

La souche construite *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) aussi appelée WCF47 (pCF218) (pCF372) est un biosenseur d'induction d'AHLs, dont le transfert du gène de conjugaison est sous la régulation d'une 3-oxo-C₈-HSL exogène. Elle est mutée dans *traI*, de ce fait, ne peut pas produire d'AHL. Le plasmide pCF218 contient le gène *traR* associé au promoteur *tetR* inductible à la tétracycline. Le plasmide pCF372 contient le promoteur transcriptionnel *traI* fusionné à *lacZ* (Zhu *et al.*, 1998). Le récepteur TraR lie l'AHL exogène et active l'expression du gène fusionné *traI-lacZ*, qui se matérialise par la présence d'une coloration bleue (Figure 14B), due à la production de la β -galactosidase au contact du substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) qui est clivé par l'enzyme. A136 répond à une large gamme d'AHLs exogènes dont les C₆-C₁₄-HSLs, les dérivés oxo-AHLs et les 3-OH-C₈-C₁₀-HSLs (Steindler & Venturi, 2007), avec une meilleure réponse pour la 3-oxo-C₈-HSL (Fuqua & Winans, 1996 ; Rumbaugh *et al.*, 2011b). L'activité d'A136 est mise en évidence par la mesure de l'absorbance liée à l'activité de la β -galactosidase, matérialisée par la présence de la coloration bleue (Geske *et al.*, 2005).

La souche *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372) (pJZ384) (pJZ410) est un autre biosenseur construit qui affiche environ deux-cent fois plus de sensibilité que la souche A136 et est capable de détecter une large gamme d'AHLs, allant de la 3-oxo-C₄-HSL à la 3-oxo-C₁₈-HSL et de la C₄-HSL à la C₁₈-HSLs (Rumbaugh *et al.*, 2011a; Zhu *et al.*, 2003).

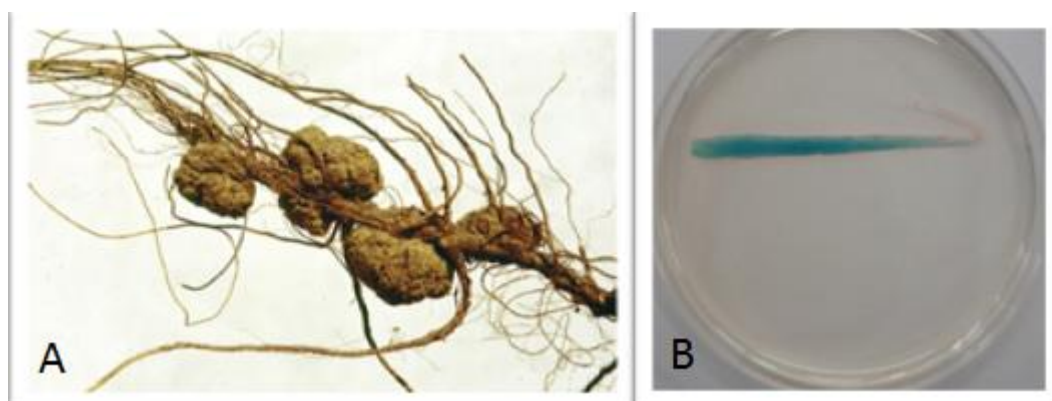


Figure 14 QS chez *A. tumefaciens*.

(A) Tumeur de la galle du collet chez les plantes infectées (<http://french.beijingreview.com.cn>) (B) coloration bleue due à l'hydrolyse du X-gal chez *A. tumefaciens* A136 (Harshad *et al.*, 2014)

3.8.2. *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum est une bactérie Gram négatif communément trouvée dans l'eau et dans le sol (Dessaux *et al.*, 2004). La souche sauvage *C. violaceum* ATCC 31532 produit la C₆-HSL qui régule la production d'une variété de facteurs notamment la violacéine, des antibiotiques, le cyanure d'hydrogène, des exoprotéases, la chitinase... (Chernin *et al.*, 1998 ; McClean *et al.*, 1997 ; Morohoshi *et al.*, 2008). En soumettant cette souche à une double mutation par insertion de transposon mini Tn5 au niveau de l'homologue de *luxI* (*cviI*), et au niveau d'un locus répresseur, des auteurs McClean et collaborateurs en 1997 ont obtenu un mutant défectueux en production d'AHL. Il s'agit de la souche *C. violaceum* CV026, capable de synthétiser la violacéine (coloration pourpre) en réponse à une C₆-HSL exogène (Figure 15B). Comme contrôle positif de CV026 dans les bio-essais d'induction du QS, il est généralement utilisé la souche parentale pigmentée *C. violaceum* ATCC 31532 (McClean *et al.*, 1997), ou encore la souche non pigmentée (ATCC 31532) (McClean *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2004 ; Rumbaugh *et al.*, 2011a).

D'autres AHLs ont aussi été capables d'induire la synthèse de la violacéine chez CV026. Il s'agit de la C₈-HSL et la 3-oxo-C₆-HSL. Toutefois, elles sont toutes les deux 6 fois moins actives que la C₆-HSL (McClean *et al.*, 1997). En revanche, les AHLs à longue chaîne acyle (de C₁₀ à C₁₄) n'ont aucun effet activateur sur la production de violacéine de CV026 (Steindler & Venturi, 2007). La C₁₀-HSL et son dérivé 3-oxo-C₁₀-HSL auraient quant à elles un effet antagoniste sur la production de violacéine chez CV026.

Une autre souche sauvage, *C. violaceum* ATCC 12472 produit la violacéine sous la régulation de la C₆-HSL (Figure 15A). Elle est généralement utilisée dans les bio-essais d'inhibition du QS (Martinelli *et al.*, 2004; McLean *et al.*, 2004 ; Morohoshi *et al.*, 2008).

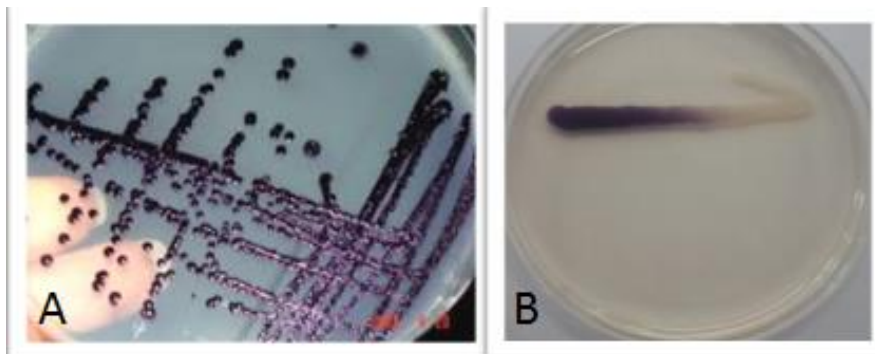


Figure 15 QS chez *C. violaceum*.

(A) colonies violettes de *C. violaceum* ATCC 12472 (<http://germsandworms.wordpress.com>) (B) coloration pourpre due à la production de violacéine chez *C. violaceum* CV026 (Harshad *et al.*, 2014).

3.8.3. Techniques de mise en évidence de l'activité QS des biosenseurs

Différentes techniques ont été décrites dans la littérature, permettant de mettre en évidence ou de quantifier l'activité des biosenseurs. Il s'agit des stries croisées (stries en forme de T-) sur plaque, du recouvrement de la plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) et de la quantification de l'activité de la β -galactosidase, de la production de luminescence, de la fluorescence ou encore de la violacéine... (Steindler & Venturi, 2007).

3.8.3.1. Stries croisées

Dans la technique des stries croisées, la souche d'essai est striée sur un milieu solide gélosé à proximité du biosenseur, de sorte à former deux stries en forme de «T» (stries T-). La production d'AHL par la bactérie test entraîne un changement phénotypique, soit un changement dans la coloration chez le biosenseur. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la proximité des deux souches (Andersen *et al.*, 2001 ; Rumbaugh *et al.*, 2011a ; Steindler & Venturi, 2007).

3.8.3.2. Recouvrement de la plaque CCM

Dans la technique de recouvrement de la plaque CCM, les extraits organiques de cultures de bactéries en phase post exponentielle de croissance sont d'abord partiellement purifiés en chromatographie sur couche mince en phase inverse. Ensuite, la plaque de chromatographie est recouverte avec une suspension molle d'agar contenant le biosenseur. La séparation par CCM couplée à la détection par le biosenseur donne un indice visuel, rapide et direct de la présence d'AHLs dans l'extrait de la bactérie testée (Schaefer *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 1997).

3.8.3.3. Quantification de l'activité QS grâce à système rapporteur

Les biosenseurs peuvent aussi être utilisés pour quantifier l'activité QS par la mesure de l'activité du système rapporteur présent dans le biosenseur. Afin d'effectuer une quantification précise, il est nécessaire de déterminer à l'aide d'une AHL synthétique la quantité minimale d'AHL nécessaire pour déclencher une réponse, ainsi que celle qui sature la réponse et de tracer une relation linéaire dose-réponse.

Tableau 5 Caractéristiques des biosenseurs utilisés en induction du QS (Steindler & Venturi, 2007).

Souches	Modification génétique	Système rapporteur	Détection	AHLs reconnues	Récepteur	Références
Courtes chaînes d'AHLs						
<i>C. violaceum</i> Cv026	Transposon mini Tn5	Opéron <i>vio</i>	Violacéine	C ₆ -HSL	CviR	(McClellan <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> JM109	Plasmide pSB406	<i>luxCDABE</i>	Bioluminescence	3-oxo-C ₆ -HSL	LuxR	(Winson <i>et al.</i> , 1995)
<i>E. coli</i> VJ533	Plasmide pHV200I	<i>luxCDABE</i>	Bioluminescence	3-oxo-C ₆ -HSL	LuxR	(Pearson <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. coli</i> JM109	Plasmide pSB536	<i>luxCDABE</i>	Bioluminescence	C ₄ -HSL	AhyR	(Swift <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> WM54 et JLD27-1	Plasmide pAL101+	<i>luxCDABE</i>	Bioluminescence	C ₄ -HSL	RhlR	(Lindsay & Ahmer, 2005)
<i>E. coli</i> MT102	pJBA130 pJBA132	<i>gfp</i>	Gfpmut3 fluorescence	3-oxo C ₆ C ₆ , C ₈ -HSLs	LuxR	(Andersen <i>et al.</i> , 2001)
Longues chaînes d'AHLs						
<i>E. coli</i> JM109	Plasmide pSB1075	<i>luxCDABE</i>	Bioluminescence	3-oxo-C ₁₂ -HSL 3-oxo-C ₁₀ -HSL	LasR	(Winson <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. coli</i> MG4	Plasmide pKDT17	<i>lacZ</i>	Coloration bleue	C ₁₀ -C ₁₂ -HSLs ; 3-oxo-(C ₁₀ -C ₁₀)-HSL	LasR	(Cha <i>et al.</i> , 1998)
Large gamme d'AHLs						
<i>A. tumefaciens</i> NT1	pZLR4	<i>lacZ</i>	Coloration bleue	3-oxo-(C ₁₄ -C ₁₂)-HSL ; 3-OH (C ₆ , C ₈ , C ₁₀)-HSL	TraR	(Cha <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. tumefaciens</i> WCF47 ou A136	Plasmides pCF218 pCF372	<i>lacZ</i>	Coloration bleue	3-oxoC ₈ -HSL ; 3-oxoC ₆ -HSL	TraR	(Zhu <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. tumefaciens</i> KYC55	Plasmides pJZ384 ; pJZ410 ; pJZ372 ;	<i>lacZ</i>	Coloration bleue	La plupart des AHLs	TraR	(Zhu <i>et al.</i> , 1998)
3-hydroxy-AHLs						
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79	Plasmide pSF105 ; pSF107	<i>phzA-lacZ</i>	Activités β-galactosidase et glucuronidase	3-OH (C ₆ , C ₈ , C ₁₀)-HSL	PhzR	(Khan <i>et al.</i> , 2005)
AHLs inhabituelles						
<i>S. meliloti</i> Rm11558 et Rm1159	Plasmide pJNSinR	<i>lacZ</i>	Coloration bleue	3-oxo (C ₁₄ -C ₁₆)-HSL ; C ₁₆ -HSL	SniR	(Llamas <i>et al.</i> , 2004)

4. Rôle du QS dans la formation de biofilm

La formation de biofilm et le QS sont deux caractéristiques centrales et interconnectées de la vie sociale des bactéries (Nadell *et al.*, 2008). Ainsi, le QS peut contribuer à la formation et à la maturation du biofilm bactérien à travers un processus de différenciation strictement contrôlé (Dobretsov *et al.*, 2009 ; Kjelleberg & Molin, 2002) (Tableau 6).

Les AHLs peuvent affecter plusieurs aspects de la dynamique du biofilm tels que l'hétérogénéité, l'architecture, la résistance au stress et la maintenance. Par exemple, certaines bactéries sont capables de coordonner leur adhésion et la maturation de leur biofilm par le QS via les AHLs (Waters & Bassler, 2005). Selon Huang et collaborateurs en 2009, environ 30% des espèces bactériennes présentes dans les biofilms subtidals sont capables de produire des AHLs qui jouent un rôle dynamique au cours du développement des biofilms. De façon générale, les cellules en biofilm présentent une densité cellulaire beaucoup plus élevée que les cellules planctoniques flottant librement dans l'environnement aquatique ; ce qui permet d'atteindre le quorum bactérien nécessaire à l'expression synchronisée d'un ensemble de groupes gènes, contrôlé par le QS (Parsek & Greenberg, 2005).

4.1. Rôle du QS dans les différentes étapes du développement du biofilm

L'implication du QS dans la formation de biofilm chez les bactéries a été largement examinée par plusieurs équipes de recherche. Dans plusieurs cas, la formation de biofilm par des bactéries semble être sous le contrôle du QS, tandis que d'autres cas, cela ne semble pas l'être (Parsek & Greenberg, 2005). Chacun des stades du développement du biofilm bactérien peut être sous le contrôle du QS. Ainsi, l'attachement des bactéries à une surface, la maturation du biofilm et la dispersion des bactéries du biofilm peuvent être contrôlés par le QS (Parsek & Greenberg, 2005; Sauer *et al.*, 2002).

4.1.1. Attachement

Peu d'études ont rapporté l'implication du QS dans les stades initiaux du développement du biofilm, c'est-à-dire dans l'attachement, la mobilité, notamment parce que le système en lui-même nécessite une certaine densité de cellules bactériennes (Davies *et al.*, 1998). Chez de rares bactéries comme *P. aeruginosa*, le QS devient actif pendant l'attachement irréversible (Sauer *et al.*, 2002). Chez les bactéries gastro-intestinales

pathogènes de l'homme *Helicobacter pylori* et *S. typhimurium*, le QS peut également être impliqué dans la phase d'attachement à travers le gène régulateur *luxP* (Cole *et al.*, 2004 ; Prouty *et al.*, 2002). Chez certaines bactéries telle que *Serratia liquefaciens*, la colonisation de la surface à travers le swarming nécessite l'implication d'un système QS par la C₄-HSL et les gènes *swrI/swrR* (Labbate *et al.*, 2004; Lindum *et al.*, 1998).

4.1.2. Maturation

Plusieurs études ont montré que le QS contrôle la maturation du biofilm chez plusieurs bactéries Gram négatif, notamment *Serratia liquefaciens* MG1, impliquant les gènes *bsmA* et *bsmB* et la C₄-HSL (Labbate *et al.*, 2004), *Burkholderia cepacia* (*cepI/cepR*) (Huber *et al.*, 2001), *P. aeruginosa* via le circuit QS *lasI/lasR*/3-oxo-C₁₂-HSL et *rhlI/rhlR*/C₄-HSL (Davies *et al.*, 1998 ; Waters & Bassler, 2005), *Vibrio cholerae* via le circuit QS *luxO* (Hammer & Bassler, 2003), *Aeromonas hydrophila* (*ahyI/ahyR*/ C₄-HSL) (Lynch *et al.*, 2002; Swift *et al.*, 1999), *Streptococcus mutans* (AI-2/*luxS*) (Merritt *et al.*, 2003). Une mutation au niveau de l'un des homologues de *luxI* ou de *luxR* chez ces bactéries entraîne la formation d'un biofilm flasque, structurellement non différencié.

4.1.3. Dispersion

Les cellules individuelles au sein d'un biofilm sont capables de quitter le biofilm chez diverses espèces bactériennes. Le processus de dispersion et/ou d'agrégation permet aux bactéries de coloniser de nouvelles surfaces et de réinitialiser ainsi le développement du biofilm (Parsek & Fuqua, 2004). Chez certaines bactéries, la dispersion bactérienne serait sous la régulation du QS. Il peut être citer en exemple la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* (*cerI/cerR*) (Puskas *et al.*, 1997), la bactérie entérique pathogène de l'homme *Yersinia pseudotuberculosis* (*ypsI/ypsR*) (Atkinson *et al.*, 1999) et la bactérie pathogène des plantes *Xanthomonas campestris* (*rpfF*) (Dow *et al.*, 2003). En effet, en conditions de surpeuplement au niveau de niches où les nutriments viennent à manquer, le QS peut être un moyen de médiation idéal des bactéries pour quitter le biofilm, afin de coloniser de nouvelles surfaces (Parsek & Greenberg, 2005). Il a été montré qu'une mutation au niveau des gènes impliqués dans la dispersion chez les bactéries concernées entraîne pour la plupart une hyper agrégation et/ou une augmentation de la formation du biofilm.

4.2. Exemple d'implication du QS dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*

Les travaux selon lesquels *P. aeruginosa* produit au moins deux signaux extracellulaires impliqués dans la communication de cellules à cellules ont laissé suggérer que la formation du biofilm chez cette bactérie pourrait impliquer le QS (Davies *et al.*, 1998).

En 1998, Davies et collaborateurs ont décrit le rôle du QS dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. Ils ont vérifié lequel des deux systèmes QS basés sur les AHLs (*lasI*-3-oxo-C₁₂-HSL-*lasR* et *rhlI*-C₄-HSL-*rhlR*), était impliqué dans la maturation du biofilm chez *P. aeruginosa*. Pour cela, ils ont d'abord comparé le biofilm formé par la souche sauvage et par le double mutant Δ *lasI*-*rhlI*. Ils ont observé que le double mutant formait un biofilm fin estimé à environ 20% du biofilm de la souche sauvage. Ils ont ensuite comparé les biofilms formés par les mutants Δ *lasI* et Δ *rhlI* séparément. Ils ont fait la remarque selon laquelle le mutant *rhlI* formait un biofilm similaire à celui de la souche sauvage, tandis que le mutant *lasI* formait un biofilm semblable à celui du double mutant. Ils ont alors conclu que la maturation du biofilm chez *P. aeruginosa* est liée uniquement au système *lasI*-3-oxo-C₁₂-HSL-*lasR*. Cela montre que le QS et la formation de biofilm sont étroitement reliés chez la souche *P. aeruginosa* (Parsek & Greenberg, 2005).

4.3. Avantages du QS pour les bactéries en biofilm

Le QS au sein d'un biofilm peut conférer aux bactéries certains avantages que leurs homologues dépourvus de système QS ne possèdent pas forcément. Par exemple, le déclenchement du QS à forte densité cellulaire peut permettre aux bactéries d'activer ou de désactiver la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS) de manière à accroître leur capacité concurrentielle vis-à-vis d'autres espèces au sein du biofilm (Nadell *et al.*, 2008 ; Xavier & Foster, 2007). La diminution de la production d'EPS, conférerait donc aux bactéries l'avantage de rediriger l'énergie utilisée pour la production d'EPS vers la division cellulaire et la croissance du biofilm, avant leur dissémination vers une nouvelle niche (Nadell *et al.*, 2008). C'est l'exemple de la bactérie *V. cholerae* qui arrête de produire l'EPS à haute densité cellulaire (Watnick & Kolter, 1999). Un autre avantage est que dans le cadre de la compétition au sein de biofilm multi-espèces, certaines bactéries peuvent utiliser le QS pour réguler l'expression des gènes qui codent pour la production de molécules toxiques, dirigées contre d'autres bactéries ou d'autres organismes. C'est le cas de la production de la violacéine par certaines bactéries comme *C. violaceum* qui aurait montré un effet antibactérien intéressant contre plusieurs bactéries Gram positif et négatif (Durán *et al.*,

1983). C'est aussi le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui produit de l'éthanol en situation de biofilm, toxique pour les autres organismes (Hogan, 2006).

Tableau 6 Différentes implication du QS dans la formation de biofilm chez les bactéries.

Bactéries	Signaux QS	Synthase/ Récepteurs QS	Processus contrôlé par le QS	Références
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C ₄ -HSL	<i>swrI/swrR</i>	Attachement	(Labbate <i>et al.</i> , 2004)
<i>Helicobacter</i> <i>Pylori</i> SD14		<i>luxS</i>	Attachement	(Cole <i>et al.</i> , 2004)
<i>Salmonella</i> <i>thyphimurium</i>		<i>luxS</i>	Attachement	(Prouty <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	3-oxo-C ₁₂ -HSL C ₄ -HSL	<i>lasI/lasR</i> <i>rhlI/rhlR</i>	Maturation du biofilm	(Davies <i>et al.</i> , 1998 ; Waters & Bassler, 2005)
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C ₄ -HSL	<i>bsmA</i> et <i>bsmB</i>	Maturation du biofilm	(Labbate <i>et al.</i> , 2004)
<i>Burkholderia cepacia</i> H111	C ₈ -HSL	<i>cepI/cepR</i>	Maturation du biofilm	(Huber <i>et al.</i> , 2001)
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor C6706str2		<i>luxO</i>	Répression du biofilm	(Hammer & Bassler, 2003)
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB3610		<i>yveQ/yveR</i>	Maturation du biofilm /sporulation	(Branda <i>et al.</i> , 2001)
<i>Aeromonas hydrophila</i> A1	C ₄ -HS	<i>ahyI/ahyR</i>	Maturation du biofilm	(Swift <i>et al.</i> , 1999)
<i>Streptococcus mutans</i> 25172 et GS-5	AI-2	<i>LuxS</i>	Maturation du biofilm	(Merritt <i>et al.</i> , 2003 ; Yoshida <i>et</i> <i>al.</i> , 2005)
<i>Streptococcus</i> sp.	CSP	<i>ComC</i>	Maturation du biofilm	(Cvitkovitch <i>et al.</i> , 2003)
<i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i> 2.4.1	7,8-cis-C ₁₄ -HSL	<i>cerI/cerR</i>	Dispersion	(Puskas <i>et al.</i> , 1997)
<i>Yersinia</i> <i>Pseudotuberculosis</i> 90/54	C ₈ -HSL	<i>ypsI/ypsR</i>	Dispersion	(Atkinson <i>et al.</i> , 1999)
<i>Xanthomonas</i> . <i>campestris</i> 8004	Facteur DSF	<i>rpfF</i>	Dispersion	(Dow <i>et al.</i> , 2003)

5. Inhibition du quorum sensing

L'inhibition du *quorum sensing* (QSI), aussi appelé *quorum quenching* (QQ) (Uroz *et al.*, 2009), est une nouvelle approche de lutte contre les infections et les biofilms bactériens dans le domaine marin ou médical (Rasmussen & Givskov, 2006). La formation de biofilm étant dans bien des cas sous le contrôle du QS, la perturbation du QS serait une bonne alternative pour limiter le développement du biofilm, voire à plus grande échelle du biofouling (Dobretsov *et al.*, 2009; Geske *et al.*, 2005; Sauer *et al.*, 2002).

L'exemple le plus marquant de l'inhibition du QS dans le milieu marin est l'interférence du QS des bactéries marines par une furanone halogénée, molécule isolée de l'algue marine rouge *Delisea pulchra* (De Nys *et al.*, 1995; Manefield *et al.*, 1999; Maximilien *et al.*, 1998). Les bactéries marines ainsi que d'autres organismes marins peuvent produire des molécules qui interfèrent avec le QS et donc avec le développement des biofilms formés par d'autres bactéries (Bauer & Robinson, 2002). Chez les bactéries Gram négatif, trois différentes cibles sont impliquées dans l'inhibition du QS. Il s'agit (i) du signal, généralement les AHLs, (ii) du récepteur et (iii) la synthase (Rasmussen & Givskov, 2006). La stratégie d'inhibition du QS consisterait à (i) dégrader l'AHL par des méthodes métaboliques, chimiques ou enzymatiques, (ii) bloquer le site de fixation de l'AHL au niveau du récepteur et (iii) empêcher la synthase de synthétiser l'AHL. Le composant QS le plus ciblé dans les stratégies d'inhibition du QS est le récepteur, car en empêchant l'AHL de se lier au récepteur, celui-ci ne pourra pas agir en tant que régulateur transcriptionnel (Rasmussen & Givskov, 2006).

Les molécules QSIs peuvent être soit naturelles, sécrétées par des organismes vivants tels que les bactéries, les champignons, les algues, les éponges ainsi que les plantes et les animaux, soit chimiquement synthétisées (Kalia, 2013).

5.1. Inactivation des AHLs (i)

5.1.1. Inhibition des AHLs par d'autres AHLs

Certaines bactéries produisent des signaux du QS qui en retour peuvent interférer fortement avec les signaux QS d'autres bactéries. C'est le cas de certaines AHLs qui inactivent d'autres AHLs. Un exemple connu est la C₆-HSL produite par *C. violaceum*, à l'origine de la production de violacéine (McClean *et al.*, 1997), qui serait inactivée par la C₁₀-

HSL produite par *Burkholderia pseudomallei* (Ulrich *et al.*, 2004) et par des AHLs longues de plus de dix atomes de carbone (McClean *et al.*, 1997). Schaefer et collaborateurs en 1996, ont décrit des analogues d'AHLs, qui inhibent jusqu'à 80% l'activité de la 3-oxo-C₆-HSL chez *V. fischeri* (Schaefer *et al.*, 1996a).

5.1.2. Inhibition des AHLs par des molécules synthétiques ou commerciales

D'autre part, la production et l'activité des AHLs des bactéries peuvent être inhibées par des molécules synthétiques et commerciales. Plusieurs molécules synthétiques qui ont été décrites dans la littérature auraient un effet sur les AHLs. Certaines d'entre elles dont le triclosan, posséderait la capacité d'inhiber l'énol-ACP réductase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse des AHLs, ce qui réduirait la production des AHLs (Hoang & Schweizer, 1999). Une autre molécule commerciale, la curcumine a été décrite par Rudrappa et Bias pour réduire la production d'AHLs et donc la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1. En effet, 1 µg/mL de curcumine inhiberait la production de la C₄-HSL et de la 3-oxo-C₁₂-HSL de 2 à 25% (Rudrappa & Bais, 2008).

5.1.3. Inhibition des AHLs par des produits naturels d'organismes marins

Des molécules naturelles produites de façon générale par des organismes marins peuvent aussi inactiver les AHLs des bactéries et ainsi limiter le développement du biofilm. C'est le cas du composé halogène oxydé, l'acide hypobromeux (HOBr), sécrété par l'algue *Laminaria digitata*, capable d'interagir avec les AHLs oxydées en général et la 3-oxo-C₆-HSL en particulier (Borchardt *et al.*, 2001). Les composés antimicrobiens halogènes oxydés inactiveraient les AHLs oxydés, les empêchant d'agir comme autoinducteurs. Le mode d'action de ces agents microbiens consisterait à attaquer les AHLs par le carbone en position α , situé entre deux carbonyles. Cela résulterait en l'obtention d'une AHL dihalogénée, inactive.

Vingt-quatre pour cent des composés naturels provenant de divers organismes marins (éponges, algues, champignons, tuniciers et cyanobactéries), testés par Dobretsov et collaborateurs en 2011 inhiberaient l'activité de la C₆-HSL, de la 3-oxo-C₁₂-HSL et de la 3-oxo-C₆-HSL respectivement chez les biorapporteurs *C. violaceum* CV017 et *E. coli* DH5 α .

5.1.4. Dégradation enzymatique des AHLs

Les AHLs des bactéries peuvent également être inactivées par des enzymes. Il existe deux groupes d'enzymes qui dégradent les AHLs. Ce sont les AHL-lactonases et les AHL-acylases, identifiées chez plusieurs espèces de bactéries (Czajkowski & Jafra, 2009; Dong *et al.*, 2002).

5.1.4.1. AHL-lactonases

Les lactonases sont des enzymes qui hydrolysent le cycle lactone des AHLs aboutissant à des molécules inactives dépourvues de cycle lactone et qui réduiraient de 1000 fois l'activité des biosenseurs (Dong *et al.*, 2002). Selon Dong *et al.* en 2002, l'inactivation totale d'à peu près 20 μ M de la 3-oxo C₆-HSL peut être atteinte en 2h en présence des lactonases. Une lactonase dénommée AiiA a été identifiée chez plusieurs espèces appartenant au genre *Bacillus* telles que *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (Dong *et al.*, 2000 ; Momb *et al.*, 2008). Chez ces bactéries, la séquence peptidique de l'AiiA est identique à 90% (Dong & Zhang, 2005). Une autre lactonase dénommée AttM a été identifiée chez les bactéries Gram négatif telles qu'*A. tumefaciens*, *Arthrobacter* sp. et *Klebsiella pneumoniae* (Carlier *et al.*, 2003).

Il existe aussi des bactéries dont la synthèse produit des lactonases parallèlement aux AHLs. C'est le cas de TraI chez *A. tumefaciens* qui produit à la fois la 3-oxo-C₈-HSL et la lactonase AttM, qui dégrade la 3-oxo-C₈-HSL en conditions de privation de nutriments (Zhang & Dong, 2004). Un groupe de gènes nommé *bpi* gènes, isolés de *P. aeruginosa*, coderait pour des lactonases qui inhibent le biofilm de cette dernière et dégradent la 3-oxo-C₈-HSL chez *A. tumefaciens* (Schipper *et al.*, 2009).

La production des lactonases par les bactéries pourrait être une stratégie de compétition dans l'environnement, leur permettant d'inhiber le développement d'autres bactéries ou de contrôler leur propre population, dans le but de gérer l'espace et la nourriture au sein de leur niche de développement (Dobretsov *et al.*, 2009; Rasmussen & Givskov, 2006).

5.1.4.2. AHLs acylases

Les acylases constituent le deuxième groupe d'enzymes qui dégradent les AHLs. Elles coupent la liaison amide de la molécule d'AHL et libère l'acide gras et l'homosérine lactone, incapables d'activer chacun le QS des biosenseurs (Zhang & Dong, 2004). Des AHL-acylases

ont été identifiées chez plusieurs bactéries, notamment l'AiiD chez *Ralstonia* sp. XJ12B qui joue un rôle dans la dégradation des AHLs à longue chaîne de carbone (Lin *et al.*, 2003), la PvdQ chez *P. aeruginosa* PAO1, qui dégrade la 3-oxo-C₁₂-HSL, conduisant à la régression des facteurs de virulence (Jimenez *et al.*, 2010), l'AAC chez une souche de *shewanella*, qui serait impliquée dans la dégradation des longues chaînes acyles d'AHLs (Tait *et al.*, 2009).

5.1.5. Métabolisation des AHLs

Plusieurs bactéries sont capables soit de répondre aux signaux QS des autres bactéries, soit de les compromettre (Bauer *et al.*, 2005; Dobretsov *et al.*, 2009). Ainsi, il a été rapporté qu'il existe dans le milieu naturel des espèces bactériennes capables de métaboliser les AHLs et de perturber la régulation du QS chez des bactéries voisines. C'est le cas de la souche tellurique *Variovorax paradoxus* qui dégrade complètement les AHLs produites par les autres bactéries présentes dans son environnement, en les utilisant comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Leadbetter & Greenberg, 2000).

5.1.6. Autres facteurs inactivant les AHLs

D'autres facteurs tels que le pH, la température et la longueur de la chaîne acyle peuvent largement influencer la stabilité et l'activité biologique des AHLs (Byers *et al.*, 2002; Yates *et al.*, 2002). En effet, en milieu alcalin (pH >8,2), les AHLs sont exposées à une ouverture, et donc à la dégradation du cycle lactone. Yates et collaborateurs en 2002 ont suggéré qu'en acidifiant la culture à pH 2, le cycle lactone pouvait être reconstitué (Decho *et al.*, 2009; Yates *et al.*, 2002).

La cinétique de l'ouverture du cycle lactone est d'autant plus significative quand il s'agit de courtes chaînes d'AHLs et aussi en conditions de température élevée du milieu. Les AHLs à longues chaînes latérales telles que la 3-oxo-C₁₂-HSL subissent une dégradation du cycle lactone plus lente que celles à chaînes courtes (Decho *et al.*, 2009). La dégradation serait donc plus efficace pour les AHLs à chaînes latérales de moins de dix carbones (Byers *et al.*, 2002 ; Decho *et al.*, 2009; Yates *et al.*, 2002).

5.2. Interférence avec le récepteur (ii)

L'approche la plus utilisée dans l'inhibition du QS bactérien est l'utilisation de petites molécules mimant les AHLs, qui bloquent l'activation du récepteur homologue de LuxR

(Rasmussen & Givskov, 2006). Ces molécules peuvent être naturelles, produites à la fois par les organismes procaryotes et eucaryotes ou chimiquement synthétisées. Elles ont pour rôle d'empêcher la fixation des AHLs sur le site du récepteur, en s'y fixant en lieu et place des AHLs (inhibition compétitive).

5.2.1. *Inhibiteurs naturels du récepteur*

Les inhibiteurs naturels des récepteurs de signaux QS peuvent être sécrétés par les bactéries ou par des organismes marins tels que les algues.

5.2.1.1. *Inhibiteurs procaryotes*

Les organismes unicellulaires comme les bactéries, les cyanobactéries et les microalgues procaryotes peuvent produire des métabolites secondaires qui agissent comme des molécules QSIs. Les QSIs sont des molécules structurellement identiques aux AHLs, d'où la possibilité de les mimer, afin d'entrer en compétition avec elles pour la fixation sur le site du récepteur QS. C'est l'exemple des phényléthylamides produits par la bactérie marine *Halobacillus salinus*, qui miment la C₆-HSL pour le récepteur CviR de *C. violaceum* (Teasdale *et al.*, 2009). Un autre exemple est les dicétopipérazines, synthétisées par les bactéries comme *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter agglomerans* qui entrent en compétition avec la 3-oxo-C₆-HSL pour le récepteur LuxR (Holden *et al.*, 1999). Les dicétopipérazines peuvent aussi entrer en compétition avec la C₄-HSL pour le récepteur SwiR de *Serratia liquefaciens* (Holden *et al.*, 1999). C'est aussi le cas de la molécule RNAIII produite par *Staphylococcus xylosus*, qui se fixe sur les récepteurs peptidiques chez les bactéries Gram positif (Gov *et al.*, 2004). La cyanobactérie *Blennothrix cantharidosmun* produit l'acide tumonoïque qui inhibe la bioluminescence chez *Vibrio harveyi* (Clark *et al.*, 2008). Un autre exemple est la microalgue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, qui synthétise une douzaine de substances qui ont montré une affinité pour les récepteurs LasR de *P. aeruginosa* et CepR de *Burkholderia cepacia* (Teplitski *et al.*, 2004). En plus, *Chlamydomonas reinhardtii* synthétiserait le lumichrome, un dérivé de la riboflavine qui entre en compétition avec la 3-oxo-C₁₂-HSL par stimulation de LasR (Rajamani *et al.*, 2008). Toutes ces molécules arrivent à mimer l'activité des signaux du QS en inhibant les récepteurs, ce qui affecte le QS des bactéries (Voir Tableau 7).

Tableau 7 Quelques Inhibiteurs naturels et mécanismes de perturbation du QS.
Adapté de (Dobretsov *et al.*, 2009)

Molécules QSI	Origine	Espèces	Mode d'action	Références
Enzymes dégradant les AHLs				
AHL-lactonases	Bactéries	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycoides</i> <i>A. tumefaciens</i>	Dégradation du cycle lactones des AHLs	(Dong <i>et al.</i> , 2002)
AHL-acylases	Bactéries	<i>P. aeruginosa</i> <i>Ralstonia</i> sp.	Dégradation de la chaîne acyle des AHLs	(Dong & Zhang, 2005)
Compétiteurs de signaux du QS				
AHLs: > C₁₀-HSL; 3-oxo-C₁₂-HSL	Bactéries	<i>P. aeruginosa</i>	Interférence avec les courtes chaînes d'AHLs	(McClellan <i>et al.</i> , 1997)
Lactones	Bactéries	<i>Streptomyces</i> sp.	Mime les AHLs	(Cho <i>et al.</i> , 2001)
Dikétopipérazines	Bactéries	<i>P. aeruginosa</i>	Compétition avec 3-oxo-C ₆ -HSL pour LuxR et C ₄ -HSL pour SwiR	(Holden <i>et al.</i> , 1999)
	Champignons	<i>Alternaria alternata</i>		(Fray, 2002)
Peptide inhibiteur RNAIII	Bactéries	<i>S. xylosus</i>	Compétition avec les signaux peptiques	(Gov <i>et al.</i> , 2004)
Phénethylamide	Bactéries	<i>Halobacillus salinus</i>	Compétition avec la C ₆ -HSL pour CiviR	(Teasdale <i>et al.</i> , 2009)
Acide tumonoïque	Cyanobactéries	<i>Blennothrix cantharidosmun</i>	Compétition avec la 3-oxo-C ₆ -HSL pour LuxR	(Clark <i>et al.</i> , 2008)
Lumichrome	Microalgues	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Compétition avec la 3-oxo-C ₁₂ -HSL pour LasR	(Rajamani <i>et al.</i> , 2008)
Furanones halogénées	Macroalgues	<i>D. pulchra</i>	Compétition avec la 3-oxo-C ₆ -HSL pour LuxR et avec la 3-oxo-C ₁₂ -HSL pour LasR	(Manefield <i>et al.</i> , 1999); (Hentzer <i>et al.</i> , 2002)
Autres inhibiteurs/Antibiotiques				
Malyngolide	Cyanobactéries marines	<i>Lyngbya majuscula</i>	Inconnu	(Dobretsov <i>et al.</i> , 2010)
8-<i>epi</i>-Malyngamide	Cyanobactéries marines	<i>Lyngbya majuscula</i>	Inhibition l'activité de LasR	(Kwan <i>et al.</i> , 2010)

Acide gallique	Plantes	Plantes	Inhibition la production de violacéine de CV017	(Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)
Déméthoxyencecalin	Plantes	<i>Baccharis cassinaefolia</i>	Interférence avec l'induction de la bioluminescence des biosenseurs à base de LasR et Lux R	(Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)
Hymenialdisine	Eponges	<i>Hymenia cidonidis</i>		
Acide kojique	Champignons	<i>Aspergillus</i> sp.	Interférence avec l'induction de la bioluminescence chez <i>E. coli</i> pB401	(Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)
Microcalin A et B	Cyanobactéries			

5.2.1.2. Inhibiteurs eucaryotes

Des inhibiteurs du QS ont aussi été découverts chez les organismes eucaryotes tels que les macroalgues et les champignons (Kalia, 2013) (Voir Tableau 7 ci-dessus).

La première évidence de l'interférence avec le QS des bactéries par les organismes eucaryotes marins provient de l'étude sur l'algue rouge *Delisea pulchra* qui produit des furanones halogénées (Rasmussen *et al.*, 2000). Les furanones halogénées de *D. pulchra* ainsi que leurs analogues synthétiques sont des molécules assez semblables structurellement aux AHLs (Manefield *et al.*, 1999). Cela explique leur capacité à affecter l'interaction entre la molécule AHL et sa protéine régulatrice, par une liaison de façon compétitive au site du récepteur (Givskov *et al.*, 1996). Les furanones halogénées ont été décrites comme de puissants inhibiteurs du système QS chez les bactéries Gram négatif, ayant des répercussions sur les phénotypes liés à la virulence, la production d'antibiotiques, la motilité dont le swarming ainsi que la formation de biofilm (Defoirdt *et al.*, 2004; Steinberg & De Nys, 2002). Par ailleurs, les furanones semblent avoir un effet sélectif sur la communauté bactérienne qui colonise l'algue *D. pulchra* dans son milieu naturel. Elles l'aident ainsi à contrôler la colonisation et l'encrassement de sa surface (Bauer & Robinson, 2002; Manefield *et al.*, 1999). Une autre macroalgue, l'algue rouge *Ahnfeltiopsis flabelliformis* produit trois composés (le floridoside, la bétonicine et l'acide iséthionique) qui inhibent le QS d'*A. tumefaciens*, par fixation sur le site de TraR (Kim *et al.*, 2007).

Certains champignons produisent des métabolites secondaires qui inhibent le QS bactérien. C'est le cas du champignon *Alternaria alternata* qui produit des dicétopipérazines,

qui inhibent le QS de *C. violaceum* CV026 (Fray, 2002). Un autre champignon, *Auricularia auricular* produit un pigment sombre qui inactive le QS de *C. violaceum*, par compétition avec la C₆-HSL (Zhu *et al.*, 2010).

La limitation majeure des molécules QSI naturelles est qu'elles sont synthétisées à faible quantité. Dans certains cas, lorsque l'organisme (bactéries, champignons...) peut être cultivé à haut rendement (fermenteur...), il est possible de biosynthétiser certaines de ces molécules. Bien souvent cependant, des analogues de synthèse doivent être préparés.

5.2.2. Inhibiteurs synthétiques du récepteur

La synthèse de molécules biomimétiques est donc la stratégie principale de production pour de nombreuses molécules naturelles intéressantes pour le contrôle du QS (Geske *et al.*, 2005). Les molécules QSI synthétiques peuvent être des analogues d'AHLs structurellement modifiés dans la chaîne latérale ou dans le cycle lactone, qui interagissent avec les récepteurs en lieu et place des AHLs naturelles (Kalia, 2013). C'est l'exemple de certains analogues de la 3-oxo-C₈-HSL qui inhibent fortement l'activité de TraR chez *A. tumefaciens* (Zhu *et al.*, 1998). Il s'agit généralement de composés structurellement proches des AHLs, tels que les dérivés de lactones et/ou de furanones ou de molécules structurellement distinctes des signaux naturels (Dobretsov *et al.*, 2009; Persson *et al.*, 2005). Plusieurs molécules synthétiques mimant les AHLs ont été recensées par Dobretsov et collaborateurs en 2009. C'est l'exemple des dérivés de lactones, dont le blastmycinolactole une molécule synthétique qui est naturellement isolée de *Streptomyces* sp. (Cho *et al.*, 2001 ; Dobretsov *et al.*, 2009), le *N*-(heptylsulfanylacétyle)-l-HSL (Persson *et al.*, 2005) ainsi que les dérivés de furanones, (5*Z*)-4-bromo-5-(bromométhylène)-2(5*H*)-furanone et 4-bromo-3-(1-hydroxybutyl)-5-(bromométhylène)-2(5*H*)-furanone qui interfèrent avec des homologues de LuxR (Persson *et al.*, 2004). En plus, des molécules AHLs non-natives ont montré leur capacité à inhiber l'activité du récepteur de type LuxR chez *P. aeruginosa* PAO-JP2 et chez *A. tumefaciens* WCF47 ainsi que la densité et l'organisation du biofilm formé par la souche *P. aeruginosa* PAO1 (Geske *et al.*, 2005). Certaines molécules commerciales auraient montré un effet inhibiteur sur le QS des bactéries par interférence avec les récepteurs du QS, bien que ce lien ne soit encore pas entièrement prouvé. C'est l'exemple de l'esculétine qui inhibe le QS chez *C. violaceum* CV026, *E. coli* JB523 et *P. aeruginosa* QSI2 (Brackman *et al.*, 2009), de la *p*-benzoquinone et de l'hydrate de baicaline qui inactiveraient le récepteur LuxR d'*E. coli*

JB523 (Brackman *et al.*, 2009). Une autre molécule, l'acide kojique, interférait avec le récepteur LuxR chez *E. coli* DH5 α (Dobretsov *et al.*, 2011).

Quelques inhibiteurs synthétiques du QS décrits dans la littérature ont été répertoriés dans le Tableau 8.

Tableau 8 Quelques inhibiteurs synthétiques du QS.

Adapté de (Dobretsov *et al.*, 2009)

QSI	Mode d'action	Références
Dérivés lactones		
Blastmycinolactole	Mime les AHLs	(Cho <i>et al.</i> , 2001)
N-(heptylsulfanylacetyl)-l-HSL	Mime les AHLs	(Persson <i>et al.</i> , 2005)
N-(alkylsulfanylethanoyl)-l-HSL ; N-(fluoroalkanoyl)-l-HSL, 2-2-dimethylbutanoyl-l-HSL	Mime les AHLs	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
Dérivés Furanones		
5-(α)-4-bromo-5-(bromoéthylène)-2(5H)-furanone	Mime les AHLs	(Persson <i>et al.</i> , 2004)
5-hydroxy-3-[(1R)-1-hydroxy-ethyl]-4-methylfuran-2(5H)-one	Interfère avec CviR	(Martinelli <i>et al.</i> , 2004)
Autres QSIs		
S-adénosylcystéine	Inhibe l'activité de la protéine LuxI	(Parsek <i>et al.</i> , 1999)
Triclosan	Inhibe l'énoyl-ACP réductase	(Hoang & Schweizer, 1999)
Esculétine	Bloque LuxR, CviR et LasR	(Brackman <i>et al.</i> , 2009)
p-benzoquinone	Bloque LuxR	(Brackman <i>et al.</i> , 2009)
Acide kojique	Interfère avec LuxR	(Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)
Carvacrol	Inhibe l'activité de CviI	(Burt <i>et al.</i> , 2014)
Azithromycine	Inhibe l'activité de LasI et CviI	(Tateda <i>et al.</i> , 2001)

5.3. Inhibition de la protéine synthase (iii)

La stratégie d'inhibition du QS par inactivation de la protéine synthase de type LuxI est fondamentale, car elle permettrait de bloquer le QS des bactéries en amont, afin de contrôler les infections et la formation de biofilm chez les bactéries. En effet, si aucun signal n'est synthétisé, il n'y a aucune possibilité de liaison au récepteur et les gènes sous contrôle du QS ne sont donc pas exprimés. Cependant, peu d'études sont disponibles à ce sujet. Ainsi, un analogue de la protéine SAM impliquée dans la biosynthèse des AHLs, la S-adénosyl-cystéine pourrait inhiber l'activité de l'homologue de LuxI (RhII) chez *P. aeruginosa*, à plus de 97% (Parsek *et al.*, 1999). De plus, des études ont montré que certaines molécules commerciales comme l'azithromycine et le carvacrol interféreraient avec les homologues de LuxI, donc avec la synthèse des AHLs. En effet, 2 µg/mL d'azithromycine suffiraient à inhiber totalement le QS de *P. aeruginosa* qui serait partiellement restauré en présence d'AHLs exogènes, ce qui laisse suggérer que l'azithromycine pourrait interférer directement avec la synthèse de la 3-oxo-C₁₂-HSL et de la C₄-HSL, conduisant à la réduction de la production des facteurs de virulence (Tateda *et al.*, 2001). Une autre étude conduite par Burt et collaborateurs en 2014, a révélé que 3 mM de carvacrol inhibait la production d'AHLs au niveau de l'expression du gène de la synthase CviI chez *C. violaceum* 12472.

5.4. Critères de sélection des inhibiteurs du QS (QSI)

Selon Kalia en 2013, un inhibiteur du QS est dit efficace s'il réunit les critères suivants : (i) être de petite taille et capable de réduire de manière efficace l'expression des gènes régulés par le QS, (ii) avoir une forte spécificité pour un régulateur donné, (iii) ne doit pas affecter la croissance du biosenseur (toxicité), (iv) être chimiquement stable et résistant aux dégradations par les différents systèmes métaboliques de la cellule hôte.

Il est nécessaire d'évaluer la toxicité d'un composé naturel ou synthétique considéré comme un inhibiteur putatif du QS, afin de détecter d'éventuels faux positifs (Defoirdt *et al.*, 2013a). Trois approches permettent d'évaluer la toxicité d'une molécule QSI vis-à-vis des bactéries. (i) Vérifier que l'effet d'inhibition se produit à une concentration inférieure ou égale à la concentration minimale d'inhibition, (ii) vérifier qu'à cette concentration il n'y ait pas d'impact sur la densité cellulaire après une certaine période d'incubation et aussi sur la cinétique de croissance (iii) (Defoirdt *et al.*, 2013b). Defoirdt et collaborateurs ont décrit un faux positif, inhibiteur de la bioluminescence de *V. harveyi*. Il s'agit du pyrogallol qui tuerait la bactérie en conditions de limitation de nutriments.

5.5. Criblage des molécules QSIs

L'effet inhibiteur des molécules QSIs est testé à partir des biosenseurs. En présence d'une molécule inhibitrice efficace du QS, l'activité/phénotype dépendant du QS (violacéine, bioluminescence....) du biosenseur est soit réduite, soit totalement inhibée (Rasmussen *et al.*, 2000). Avec des banques importantes de molécules à tester, ces tests doivent être effectués par une approche « haut débit » (c'est-à-dire en microplaques 96 ou 384 puits) et sont même parfois robotisés. Puis comme expliqué plus haut, les inhibiteurs actifs doivent être validés selon un certain nombre de critères dont fait partie la toxicité.

6. Bactéries étudiées dans le cadre de la thèse

6.1. Souches de la Toulon Collection

Cette partie est essentiellement consacrée à la description des genres bactériens qui ont fait l'objet de cette thèse. Il s'agit des bactéries de la collection de Toulon (TC) provenant de la souchothèque du laboratoire MAPIEM. Les souches TC sont des bactéries marines isolées de la côte Méditerranéenne Française (rade de Toulon, France, 43°06'23''N-5°57'17''E). En effet, le bassin Méditerranéen renferme une biodiversité marine et terrestre (Danoravo *et al.*, 2010), parmi lesquelles des espèces benthiques telles que les bactéries et les diatomées (Briand *et al.*, 2012).

Les souches TC ont été décrites pour la première fois par Camps et collaborateurs en 2011 et ont également fait l'objet de travaux de thèse par Brian-Jaisson *et al.* en 2014. Elles ont été isolées en 2008 puis en 2010, de biofilms naturels développés sur divers substrats inertes, notamment des plaques de polystyrène, de silicone et de silicone fluoré immergés pendant 6 ou 24h, à une profondeur de 1 m dans la rade de Toulon (Camps *et al.*, 2011). Elles ont été dénommées TC_i (i=1 à 62) parmi lesquelles quinze ont été pour le moment génétiquement caractérisées. Les souches TC_i génétiquement caractérisées appartiennent à sept genres dont les genres *Halobacillus*, *Persicivirga*, *Polaribacter*, *Agarivorans*, *Shewanella*, *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas* (Voir Tableau 9). La majorité de ces genres appartient à la classe des γ -protéobacteria (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Ce sont des bacilles Gram négatif excepté TC1, mobiles excepté TC4, TC5 et TC7. La majorité d'entre elles sont capables de former un biofilm mature en microplaque à partir 24h, sur différents milieux de culture marins excepté TC5 (Brian-Jaisson *et al.*, 2014).

Tableau 9 Affiliation taxonomique des bactéries marines de la Toulon Collection.
Basée sur l'alignement de l'ADNr 16 S (Brian-Jaisson *et al.*, 2014).

Noms	Meilleurs scores d'alignement taxonomique	Dénomination putative
TC1	<i>Halobacillus trueperi</i> souche DSM 10404	<i>Halobacillus trueperi</i> TC1
TC4	<i>Persicivirga dokdonensis</i> souche DSW-6	<i>Persicivirga (Nonlabens) mediterranea</i> TC4
TC5	<i>Polaribacter dokdonensis</i> souche DSW-5	<i>Polaribacter</i> sp.TC5
TC6	<i>Agarivorans albus</i> souche MKT 106	<i>Agarivorans</i> sp.TC6
TC7	<i>Persicivirga dokdonensis</i> souche DSW-6	<i>Persicivirga (Nonlabens) mediterranea</i> TC7
TC8	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> souche K-W45	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8
TC9	<i>Shewanella surugensis</i> souche c959	<i>Shewanella</i> sp. TC9
TC10	<i>Shewanella japonica</i> souche KMM 3299	<i>Shewanella</i> sp. TC10
TC11	<i>Shewanella pneumatophori</i> souche SCRC-2738	<i>Shewanella</i> sp. TC11
TC12	<i>Alteromonas genovensis</i> souche LMG 24078	<i>Alteromonas genovensis</i> TC12
TC13	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> souche CERBOM CH10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TC13
TC14	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> souche UL12	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> TC14
TC15	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> souche IAM 14160	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.TC15

6.2. Genre *Pseudoalteromonas*

Les espèces du genre *Pseudoalteromonas* sont des bactéries marines, définies sur la base de séquences du gène de l'ADNr 16S (Bowman, 2007) (Figure 16). Ce sont des bacilles Gram négatif, à la fois pigmentés et non pigmentés, aérobies strictes, mobiles à l'aide de flagelles latéraux et/ou polaires, possédant un métabolisme chimio-hétérotrophe. Elles ont besoin pour leur croissance des ions Na^+ (Bozal *et al.*, 1997). C'est un genre communément représenté dans l'environnement marin (Holmström *et al.*, 2002). De façon générale, les espèces appartenant au genre *Pseudoalteromonas* ont été isolées d'hôtes eucaryotes telles que les algues marines, les moules, les éponges et les tuniciers... (Egan *et al.*, 2001; Holmström & Kjelleberg, 1999).

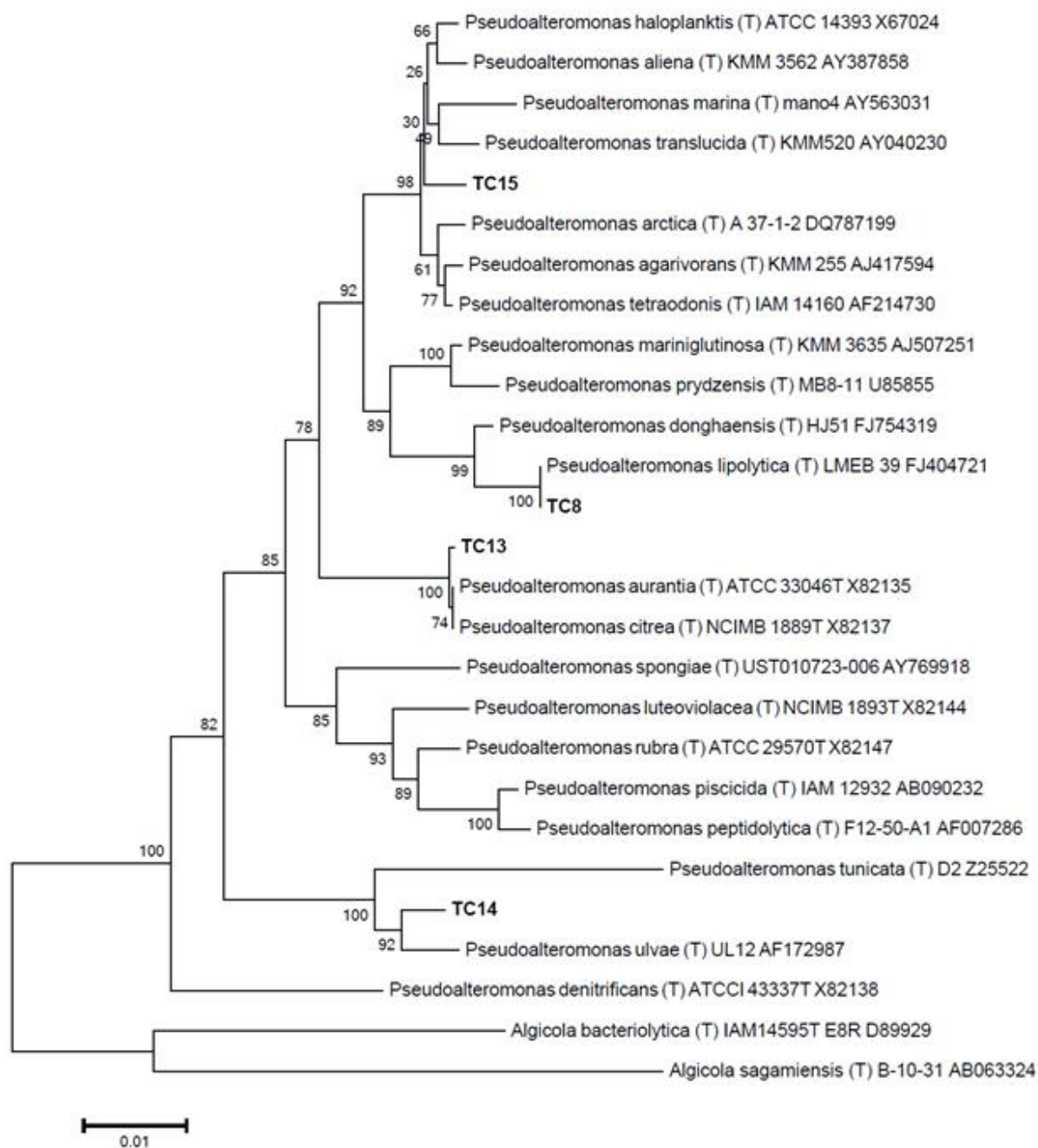


Figure 16 Arbre phylogénétique des souches du genre *Pseudoalteromonas*. (TC8, 13,14 et 15) Il est basé sur l'alignement des séquences des gènes de l'ADNr 16S. Seule TC14 appartient à l'espèce *ulvae* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014).

Originellement, bon nombre des espèces de ce genre faisaient partie d'un seul et unique genre, le genre *Alteromonas* qui a été taxonomiquement réorganisé en deux genres distincts. Le genre *Alteromonas* qui comprend actuellement une seule espèce et le nouveau genre *Pseudoalteromonas* (Gauthier *et al.*, 1995). En 2007, le genre *Pseudoalteromonas* comprenait environ 43 espèces et 885 souches non caractérisées (NCBI Taxonomy Browser, February 2007) (Skovhus *et al.*, 2007). Selon Holmström & Kjelleberg (1999), ce nouveau genre a suscité un grand intérêt dans le monde marin pour deux principales raisons. D'une

part, parce que les espèces de ce genre sont très souvent retrouvées en association avec des hôtes eucaryotes dans le milieu marin et d'autre part, parce que de nombreuses espèces produisent des métabolites biologiquement actifs qui ciblent un large éventail d'organismes. Ceci a poussé les chercheurs à élucider les mécanismes impliqués dans les interactions entre hôtes et microbes. Les *Pseudoalteromonas* sont donc un réservoir de substances à activité AF (Skovhus *et al.*, 2007).

6.2.1. Activités biologiques des *Pseudoalteromonas*

Les bactéries marines appartenant au genre *Pseudoalteromonas* sont connues pour être des productrices d'une variété de composés extracellulaires biologiquement actifs, y compris des agents antibactériens qui peuvent conduire à des effets antifouling (Bowman, 2007 ; Holmström & Kjelleberg, 1999). De nombreuses études ont ainsi fait état de diverses activités biologiques chez différentes espèces du genre *Pseudoalteromonas*. Les espèces *P. tunicata*, *P. aurantia*, *P. citrea*, *P. luteoviolacea*, *P. rubra* et *P. ulvae* ont été particulièrement étudiées. Les activités biologiques les plus mises en exergue sont les activités antibactériennes, antibiofilm/antifouling, antifongique, algicide, antitumorale... Le Tableau 10 répertorie les différentes activités biologiques développées par certaines espèces pigmentées et non pigmentées au sein de ce genre. Ici, seules les activités antibactériennes, antibiofilm et antifouling seront détaillées.

6.2.1.1. Activité antibactérienne/Antibiofilm

Plusieurs souches de *Pseudoalteromonas* ont montré une activité antibactérienne potentielle contre plusieurs autres bactéries. L'un des exemples d'activités antibactériennes le plus connu est celui de la protéine antibactérienne AlpP, sécrétée par la souche *P. tunicata* D2 (James *et al.*, 1996). La protéine AlpP fournit à la bactérie un avantage compétitif pour la formation de biofilm dans les milieux marins (Rao *et al.*, 2005). Une autre protéine antibactérienne appelée protéine P-153 a également été identifiée chez la souche *Pseudoalteromonas* sp. X153, isolée à partir de gravier à Sainte-Anne du Portzic (France (Longeon *et al.*, 2004). En 2010, Dheilly *et al.* ont mis en évidence l'activité antibiofilm d'un composé extracellulaire contenu dans le surnageant de culture de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, isolée du golfe de Morbihan, contre les souches *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01. Aussi, une molécule, l'acide 2-méthylbutyrique, synthétisée par la souche marine *P. haloplanktis*, isolée d'une éclosion de pétoncles, a aussi révélé une activité

antibactérienne intéressante sur d'autres souches marines (Hayashida-Soiza *et al.*, 2008). Dans l'une de leurs études, Holmström et collaborateurs en 2002, ont révélé une activité antibactérienne élevée (de plus de 80%) des espèces *P. tunicata*, *P. luteoviolacea* et *P. aurantia* et une activité antibactérienne plutôt modérée, entre 40 et 50% pour les souches *P. rubra*, *P. ulvae* et *P. citrea* sur des bactéries cibles (Holmström *et al.*, 2002). D'autres bactéries telles que *P. citrea* et *P. rubra* synthétisent des composés dits polyanioniques qui exercent une activité antibactérienne intéressante (Gauthier, 1976 ; Gauthier & Flatau, 1976 ; Gauthier, 1977).

Tableau 10 Description de composés bioactifs chez plusieurs espèces appartenant au genre *Pseudoalteromonas*.

Adapté de (Bowman, 2007)

Souches	pigment	Source	Substances actives	Activités inhibitrices	Références
<i>P. aurantia</i> sp. nov. ATCC34046	orange	Eau de mer, surface d' <i>Ulva lactuca</i>	Substances antibiotiques	Activité antimicrobienne et antilarvaire	(Gauthier & Breittmayer, 1979) ; (Bowman, 2007)
<i>P. issachenkonii</i> sp. nov. KMM 3549 ^T	-	Algues marines	Isatine; composé brun-rougeâtre inconnu Protéases	Activités antifongique ; hémolytique, algicide ; AF	(Ivanova <i>et al.</i> , 2002) ; (Kalinovskaya <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. citrea</i> NCMB1889 et ATCC 29719 ^T	jaune	Eau de mer ; Algues	Substances inconnues	Activité antibactérienne et antifongique; inhibition de la fixation des larves d'invertébrés	(Gauthier, 1977) ; (Holmström & Kjelleberg, 1999); (Ivanova <i>et al.</i> , 1998) (Gauthier, 1976) ;
<i>P. rubra</i> NCMB 1889	rouge	Eau de mer	Molécules polyanioniques de haut poids moléculaire ; acides rubrenoïques prodigiosine	Inactive la respiration bactérienne ; Activité antimalariale ; inhibe la prolifération des lymphocytes T	(Gerber & Gauthier, 1979) (Bowman, 2007)
<i>P. denitrificans</i> ATCC 43337 ^T	rouge	Eau de mer	Pigment rouge cyclo prodigiosome chlorohydrate Substances auto-toxiques	Activité antimalariale ; inhibition de la prolifération des lymphocytes T	(Kim <i>et al.</i> , 1999) ; (Enger <i>et al.</i> , 1987) ; (Bowman, 2007)
<i>P. haloplanktis</i> TAC125 et S5B	-	Eau de mer	Dicétopipérazines Protéases extracellulaires	Effet probiotique Altération des poissons	(Mitova <i>et al.</i> , 2005) ; (Odagami <i>et al.</i> , 1994)

<i>P. mariocoloris</i> KMM636^T	jaune	Eponges	Bromo-alterochromides A et B	Activité antibactérienne, cytotoxicité contre les larves d'oursins	(Bowman, 2007) ; (Sobolevskaya <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. piscicida</i> ATCC 15251	jaune	Eau de mer Poissons morts	Protéines toxiques	Toxine neuro-musculaire contre les poissons et les crabes ;	(Hansen <i>et al.</i> , 1965)
<i>P. piscicida</i> X153			Protéine tétramérique vibriostatique	Activité antifongique	(Longeon <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. phenolica</i> sp. nov. O-BC30^T	brun	Eau de mer	Antibiotique MC21-A	Activité antibactérienne, contre la résistance à la méthicilline chez <i>S. aureus</i>	(Isnansetyo & Kamei, 2003) (Bowman, 2007)
<i>P. luteoviolacea</i> 9K-V9 et 9K-V10	violet	Eau de mer	Dicétopipérazines Antibiotiques Substances antibactérienne à faible poids moléculaire	Activité antibactérienne ; inhibition de la fixation des spores d'algues ; Effet cytotoxique	(Sakata <i>et al.</i> , 1982) (McCarthy <i>et al.</i> , 1994)
<i>P. tetraodonis</i> GFC^T et OK-1^T	-	Algue rouge Poisson globe	tétrodotoxine	Effet neurotoxique	(Gallacher & Birkbeck, 1993) (Simidu <i>et al.</i> , 1990)
<i>P. tunicata</i> D2	Vert foncé	Tuniciers, Algues marines	Pigment Protéine Alp	Activités AF, antimicrobienne ; inhibition de la fixation de larves d'invertébrés et de spores d'algues	(Egan <i>et al.</i> , 2002) ; (James <i>et al.</i> , 1996) ; (Holmström <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. ulvae</i> sp. nov. UL12^T et UL13	pourpre	Algues marines	Substances inconnues	Activité AF ; antilarvaire et algicide	(Egan <i>et al.</i> , 2001) (Holmström <i>et al.</i> , 2002)

- : Pas de pigments produits

6.2.1.2. *Activité antifouling*

Bien qu'il existe certains membres du genre *Pseudoalteromonas* qui ont été décrits comme induisant la fixation des larves d'invertébrés (Negri *et al.*, 2001), l'activité la plus rapportée généralement reste l'effet antifouling. Des études ont montré que des espèces de ce genre jouent un rôle de protection des surfaces vis-à-vis de la colonisation par des larves d'invertébrés et de vertébrés marins (Barbieri *et al.*, 2001), des algues (Egan *et al.*, 2000) et des tuniciers (Holmström *et al.*, 1998). Skovhus *et al.* en 2007 ont distingué un groupe d'espèces de *Pseudoalteromonas* à forte activité AF, qui produisent des composés extracellulaires inhibant la colonisation de surfaces par différents organismes marins. Ils l'ont surnommé le sous-groupe antifouling. Le sous-groupe antifouling renferme deux espèces qui sont *P. tunicata* et *P. ulvae*, qui ont été très souvent détectées sur les organismes marins les moins colonisés des eaux côtières danoises que sont le tunicier *Ciona intestinalis* et les algues vertes *U. lactuca* et *Ulvaria fusca* (Skovhus *et al.*, 2007). Bien d'autres études ont mis en évidence le caractère AF soit de l'une, soit de l'autre de ces deux espèces, soit des deux à la fois ou encore d'autres espèces. C'est le cas d'Egan *et al.* en 2001 puis en 2002, qui ont découvert le potentiel AF de deux souches de *P. ulvae* UL12^T et UL13, isolées de la surface de l'algue verte *U. lactuca* et de *P. tunicata*. Holmström et collaborateurs (1998-2002) ont aussi relevé une activité AF de quatre espèces du genre *Pseudoalteromonas*, isolées d'algues et d'éponges marines dont *P. tunicata* et *P. ulvae*, avec une forte activité AF pour *P. tunicata* sur la fixation des larves de la balane *B. amphitrite*. Une étude récente a montré que le biofilm formé par *P. tunicata*, *P. piscicida* et *P. ulvae*, toutes isolées des eaux côtières danoises, empêchaient l'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. S91 sur des surfaces en acier ainsi que la fixation des zoospores de l'algue verte *Ulva australis* (Bernbom *et al.*, 2011). Le puissant effet de compétition de *P. tunicata* serait dû selon Rao et collaborateurs à sa protéine antibactérienne AlpP qui jouerait un rôle dans la formation du biofilm de cette souche (Rao *et al.*, 2006).

6.2.2. *Quorum sensing chez Pseudoalteromonas*

Jusqu'à nos jours, la plupart des travaux qui ont porté sur les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ont été beaucoup centrés sur les exoproduits à activités biologiques des espèces appartenant à ce genre. Cependant, très peu d'études ont décrit le système de communication de type QS chez les *Pseudoalteromonas*. L'un des rares exemples de système QS décrit chez ce genre bactérien est celui de *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 qui produirait les

signaux 3-oxo-C₈-HSL et C₁₄-HSL ; la 3-oxo-C₈-HSL étant impliquée dans l'induction de la synthèse de la violacéine chez cette souche (Wang *et al.*, 2008). Une autre étude, réalisée en 2005 par Wagner-Döbler et collaborateurs sur la détection des signaux QS des α -protéobactéries associées à des hôtes, a révélé que la souche *Pseudoalteromonas atlantica* PIC 075 a été capable d'induire la fluorescence chez les biosenseurs *E. coli* MT102 et *P. putida* F117 ; cependant aucune AHL n'a pu être détectée chez *P. atlantica* PIC 075 par les analyses chromatographiques en phase gazeuse (GC-MS). Chez une autre souche de *P. atlantica*, la souche T6c, Case *et al.* en 2008 ont mis en évidence par e-BLASTP la présence de protéines du QS à savoir un homologue de LuxI et deux homologues de LuxR. De plus, une étude réalisée en 2011 sur la relation entre l'activité antibactérienne de la souche associée aux éponges *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 et le QS a rapporté que cette souche produisait trois dicétopipérazines comme autoinducteurs potentiels du QS, supposées être à l'origine de l'activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* (Guo *et al.*, 2011). Aussi, chez la souche *P. tunicata* D2W2, le régulateur transcriptionnel WmpR serait impliqué dans la régulation de l'expression du pili de type IV MSHA (Skovhus *et al.*, 2007) et dans la production de composés AF (Egan *et al.*, 2002). Selon Egan et collaborateurs en 2002, WmpR serait capable de détecter et de répondre aux changements dans l'environnement. Par ailleurs, certaines souches telles que *P. agarovorans* AJ417594 et *P. haloplanktis* CR95446, isolées de l'algue brune *Colpomenia sinuosa* produiraient des molécules inhibitrices du QS qui inactivent les signaux QS d'autres bactéries (Kanagasabhpathy *et al.*, 2009).

6.2.3. Description de *Pseudoalteromonas ulvae*

Parmi les espèces du genre *Pseudoalteromonas*, l'espèce *P. ulvae* semble être une espèce prometteuse à intérêt AF (Egan *et al.*, 2001; Skovhus *et al.*, 2007). Cette espèce a largement été décrite par Egan *et al.* en 2001, à travers les souches UL12^T et UL13 et par Brian-Jaisson *et al.* en 2014, pour la souche TC14. Elle tient son nom de l'algue verte *Ulva lactuca*, de qui elle est très souvent l'hôte. *P. ulvae* semble être une espèce ubiquitaire. En effet, elle a été isolée de différents endroits dans le monde. Nous pouvons citer la Méditerranée plus précisément la rade de Toulon (Brian-Jaisson *et al.*, 2014), les côtes orientales de l'Australie (Egan *et al.*, 2001), les eaux côtières danoises (Bernbom *et al.*, 2011; Skovhus *et al.*, 2007). Basé sur la séquence d'identité de l'ADNr 16S, *P. ulvae* semble être proche de l'espèce *P. tunicata* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Egan *et al.*, 2001) (Figure 16). Selon Skovhus *et al.* en 2007, les deux espèces formeraient le sous-groupe antifouling.

P. ulvae est une bactérie Gram négatif en forme de bâtonnet, strictement aérobie, oxydase et catalase positive, mobile par le moyen d'un seul flagelle polaire. Les souches UL12^T, UL13 et TC14 utilisent le glucose, le maltose, le citrate, le mannose et le tween 20 comme seule source de carbone et non le lactose, le sucrose, le tréhalose, le fructose, le raffinose, le sorbitol, le xylose, le cellobiose, l'érythritol, l'arabinose, le rhamnose, la L-glutamine et la DL-serine (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Egan *et al.*, 2001). Les souches UL12^T et UL13 hydrolysent la gélatine et possèdent une activité tryptophane désaminase (Egan *et al.*, 2001). Les trois souches ne produisent pas de β -galactosidase. En plus, la souche TC14 ne produit pas de β -glucuronidase et de α -glucosidase (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Les souches UL12^T et UL13 sont sensibles à la tétracycline, l'ampicilline, la kanamycine, la streptomycine, la carbénicilline, et le chloramphénicol à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et résistantes à la pénicilline D jusqu'à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Egan *et al.*, 2001).

Sa température optimale de croissance est de 23°C. Elle se croît difficilement à 4°C et aucune croissance n'est observée à partir de 35°C. Sa gamme de pH de croissance varie de 5,5 à 12, avec un optimum à pH 8. Pour croître, les souches de *P. ulvae* ont besoin d'un apport en ions Na^+ dans une concentration optimale de 1 à 2,5% de NaCl. *P. ulvae* TC14 croît en milieux VNSS et MB où elle forme des colonies violettes (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Les souches UL12^T et UL13 décrites par Egan *et al.* (2001) se développent sur VNSS, LB20, TBS avec 2% de NaCl, mais ne forment de colonies violettes qu'en VNSS (Egan *et al.*, 2001). D'autres caractéristiques de l'espèce ont été mises en évidence par Brian-Jaisson *et al.* en 2014. Elles se résument au fait que la souche *P. ulvae* TC14 est mobile par swimming, faiblement mobile par swarming et pas mobile par twitching. Elle est hydrophile, pour être capable d'adhérer fortement aux solvants polaires tels que le chloroforme (70%).

6.2.3.1. Formation de biofilm de *P. ulvae* TC14

Plusieurs espèces du genre *Pseudoalteromonas* ont été décrites comme étant capables de former un biofilm. Nous citons en exemple *P. tunicata* (Rao *et al.*, 2005), *P. ruthenica* (Saravanan *et al.*, 2006), *Pseudoalteromonas* sp. J36 (Dheilly *et al.*, 2010), *Pseudoalteromonas* sp.D41 (Ritter *et al.*, 2011) et *P. ulvae* TC14 (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Ne sera développée ici que la formation de biofilm de la souche *P. ulvae* TC14.

L'évaluation de la formation de biofilm de *P. ulvae* TC14 en BFRT, effectuée par Brian-Jaisson et collaborateurs (2014) a révélé que la souche est capable de former un biofilm mature en microplaque dès 24h en milieu VNSS ($\Delta\text{BFI} > 15$) et en milieu MB ($\Delta\text{BFI} > 20$).

C'est aussi les cas des autres souches de la collection de Toulon appartenant au genre *Pseudoalteromonas* TC8, TC13, et TC15 ; cependant, en présence de 3% de glucose en MB, TC14 ne formait que peu de biofilm.

6.2.3.2 Production de pigment pourpre

Le genre *Pseudoalteromonas* comprend à la fois des espèces pigmentées et non pigmentées (Voir Tableau 10). Parmi les espèces pigmentées, *P. luteoviolacea*, *P. tunicata* et *P. ulvae* produisent un pigment pourpre (Skovhus *et al.*, 2007). *P. luteoviolacea* produit la violacéine et la déoxyviolacéine, et est la seule bactérie marine chez qui la violacéine n'a pas été caractérisée précisément (Yada *et al.*, 2008). Treize souches de bactéries marines produisant un pigment pourpre semblable à la violacéine ont été isolées de la côte pacifique du Japon. Le pigment violet de deux d'entre-elles dont *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 et *Pseudoalteromonas* sp 710P1 a été caractérisé comme étant la violacéine (Yada *et al.*, 2008). Chez *P. ulvae* TC14, le pigment pourpre n'a jamais été caractérisé au préalable.

6.3. La violacéine

La violacéine est un pigment antibiotique à large spectre, de couleur pourpre, produite en condition aérobie par certaines bactéries telluriques comme *C. violaceum* (Demoss & Evans, 1959). C'est un pigment insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol et l'acétone. Son absorption maximale dans le méthanol serait de 585 nm (Blosser & Gray, 2000). Depuis plus de 50 ans, la violacéine produite par *C. violaceum* fait l'objet de recherche visant à mieux comprendre le mode de régulation particulier qui contrôle sa synthèse, à connaître les paramètres qui influencent sa production et à mettre en évidence ses intérêts biomédicaux et biotechnologiques (Dessaux *et al.*, 2004).

6.3.1. Structure et biosynthèse de la violacéine

La violacéine est un pigment indolique, dérivé de deux molécules de tryptophane modifiées. Elle se compose de trois sous-unités principales: le 5-hydroxyindole, l'oxindole et la 2-pyrolidone (Hoshino *et al.*, 1987) (Figure 17). Sa formule chimique est $C_{20}H_{13}N_3O_3$ et son poids moléculaire est de 343,33 (Pantanella *et al.*, 2007).

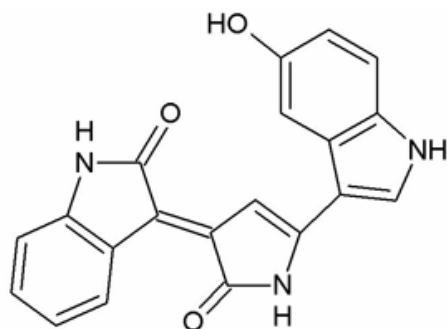


Figure 17 Structure chimique de la violacéine.

Elle est constituée de trois noyaux principaux: le 5-hydroxyindole (à gauche), la 2-pyrrolidone (au milieu) et l'oxindole (à droite) (Dessaux *et al.*, 2004).

Il est connu chez *C. violaceum* que la synthèse de la violacéine est régulée par le QS, donc liée à la densité cellulaire. Quatre gènes seraient impliqués dans la synthèse de la violacéine chez *C. violaceum*. Il s'agit des gènes *vioA* (1257 bp), *vioB* (2997 bp), *vioC* (1290 bp) et *vioD* (1122 bp), en plus d'une phase ouverte de lecture appelée *orfX*, le tout regroupé dans un opéron sur environ 8 kb (kilo-bases) (August *et al.*, 2000). Les gènes *vioA* et *vioC* codent pour des mono-oxygénases, *vioB* code pour une polykétide synthase et *vioD* pour une oxydoréductase. L'*orfX* qui semble faire partie du même opéron ne joue cependant aucun rôle apparent dans la synthèse de la violacéine. L'ensemble de ces gènes est sous le contrôle d'une régulation de type QS, dépendante des gènes *cviI* et *cviR*.

CviR est le régulateur transcriptionnel qui permet la transcription des gènes *vioABCD* lorsqu'il est lié par le signal du QS, la C₆-HSL. La C₆-HSL résulte de l'activité enzymatique de CviI (Figure 18). August et collaborateurs en 2000 ont démontré qu'une mutation dans les gènes *vioA* et *vioB* entraîne l'arrêt de la synthèse de la violacéine tandis qu'une mutation dans *vioC* et *vioD* conduit toujours à sa synthèse. Seuls les gènes *vioA* et *vioB* seraient donc indispensables à la biosynthèse de la violacéine. Sur ces différents gènes, un ou plusieurs sites de liaison du NADPH sont présents ; ce qui signifierait que le NADPH pourrait être nécessaire dans la conversion du L-tryptophane en violacéine.



Figure 18 Biosynthèse de la violacéine.

Avec les gènes *VioABCD*, contrôlant la synthèse de violacéine et les composants du QS (*cviR*, *cviI* et HHL) chez *C. violaceum* ATCC 12472 (Dessaux *et al.*, 2004)

6.3.2. Activités biologiques de la violacéine

La violacéine est un antibiotique à large spectre, efficace essentiellement contre les bactéries Gram positif, mais aussi contre certaines bactéries Gram négatif (Durán *et al.*, 1983 ; Leichstein & Van de Sand, 1945). Quoique très peu utilisée en antibiothérapie, la violacéine a pourtant démontré un intérêt thérapeutique intéressant. En 2001, Durán et Menck ont relevé une activité antibactérienne *in vitro* de la violacéine sur la souche *Mycobacterium tuberculosis*, avec une concentration minimale bactéricide (CMB) de 128 µg/mL comparable à celle de la pyrazinamide, un antibiotique antituberculeux (Durán & Menck, 2001). De plus, d'autres propriétés médicales lui ont été attribuées. En effet, la violacéine présente *in vitro* une activité antitrypanosomale très intéressante contre le trypanosome *Trypanosoma cruzi*, agent causal de la maladie de Chagas pour laquelle il n'existe pas de nos jours de traitement antimicrobien ou anti-infectieux adapté. Toutefois *in vivo*, cette activité antitrypanosomale reste faible même à des doses très élevées de l'ordre de 100 mg/kg, ce qui bien évidemment limite fortement l'usage de cette molécule en thérapie humaine (Durán & Menck, 2001). La violacéine semble également posséder une activité antiparasitaire (antileishmaniose) dirigée contre le parasite *Leishmania amazonensis* (Leon *et al.*, 2001). Cette molécule exercerait aussi une activité antitumorale via une apoptose des cellules tumorales V79, marqueurs de leucémies, de cancer des poumons et du côlon (Melo *et al.*, 2000). Enfin, elle posséderait une activité antivirale *in vitro* contre le virus de l'Herpès Simplex et le poliovirus après infection des cellules HeLa (Durán *et al.*, 2007). Ces propriétés biologiques intéressantes de la violacéine font de toutes les souches productrices de cette molécule d'intérêt, de bons candidats d'étude, afin d'optimiser les paramètres de sa production en vue d'en récolter des quantités maximales. En plus de *C. violaceum* et des souches marines précitées, d'autres

bactéries telles que *Janthinobacterium lividum* (Lu *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2002), *Duganella* sp (Wang *et al.*, 2009) ont fait objet d'étude pour leur production de violacéine.

6.3.3. Paramètres influençant la production de violacéine

De nos jours, en vue d'optimiser les rendements de la production de violacéine, une molécule à intérêt médical, les recherches se sont focalisées sur les paramètres qui pourraient influencer sa production. Ainsi en 2001, Mendes *et al.* 2001 ont montré que le glucose, l'extrait de levure, le zinc et la vitamine B2 étaient nécessaires pour accroître la production de violacéine chez *C. violaceum* CCT 3496. Toujours en 2001, Egan et collaborateurs ont trouvé que les souches *P. ulvae* UL12^T et UL13 produisaient la violacéine en VNSS et non en LB20 ni en TBS. En 2004, Antônio et Creczynski-Pasa ont abondé dans le même sens en déclarant que la quantité de la violacéine était dépendante de la source de carbone et de sa concentration dans le milieu de culture chez *C. violaceum* (Antônio & Creczynski-Pasa, 2004). Plus tard, en 2007, Pantanella et collaborateurs ont trouvé que la synthèse de violacéine de la souche *Janthinobacterium lividum* DSM1522^T était induite par des concentrations sous-inhibitrices (50-200 µg/mL) d'ampicilline, renforcée en présence de glycérol et plutôt inhibée en présence de glucose. Dans la même année, Yang *et al.* (2007) ont fait le constat selon lequel la production de violacéine chez *Pseudoalteromonas luteoviolacea* était plus élevée dans des conditions stagnantes et diminuée avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (Yang *et al.*, 2007). Enfin, en 2009 une étude réalisée sur la production de violacéine de la souche *Duganella* sp. B2 a démontré que celle-ci était optimisée par les facteurs tels que le pH, le volume et la durée de culture ainsi que les composants nutritionnels tels que le nitrate de potassium, le L-tryptophane et l'extrait de bœuf (Wang *et al.*, 2009). Les AHLs ont aussi été signalées comme étant impliquées dans la régulation de la production de violacéine. C'est le cas de la 3-oxo-C₈-HSL impliquée dans la production de la violacéine chez la souche *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 (Wang *et al.*, 2008).

7. Objectifs et plan de thèse

La présente étude qui s'inscrit dans le cadre de la recherche de stratégies antifouling respectueuses de l'environnement a pour objectif d'identifier des molécules antibiofilm basées sur l'inhibition du QS bactérien. Aussi, cette thèse visé spécifiquement (i) l'identification des molécules AHLs produites par trois bactéries marines isolées de la rade de Toulon ; (ii) la mise en place d'outils de développement d'un biosenseur marin ; (iii) la recherche de molécules naturelles et synthétiques inhibant le QS bactérien.

La thèse est rédigée en cinq chapitres selon le plan suivant :

Le premier chapitre (chapitre I) qui a fait l'état de la bibliographie sur le sujet, en détaillant en particulier la formation du biofilm et du biofouling, les stratégies antifouling développées à ce jour, le QS et son lien avec le biofilm ainsi que l'inhibition du QS. Il a aussi présenté brièvement le contexte scientifique de la thèse, en prenant soin de décrire les bactéries marines isolées de la rade de Toulon appartenant à la souche de laboratoire MAPIEM, plus particulièrement le genre *Pseudoalteromonas*.

Le deuxième chapitre (chapitre II) définira le matériel et les différentes méthodologies utilisées pour effectuer les expérimentations et mener à bien le travail de thèse.

Les trois derniers chapitres présenteront les résultats obtenus au cours de cette étude.

Tout d'abord le chapitre III qui est la première partie des résultats portera sur l'identification des AHLs produites par les bactéries marines. Différentes techniques impliquant l'utilisation des biosenseurs et des analyses spectrales ont servi pour la détection des AHLs produites par les bactéries. Aussi, la capacité d'adhésion, de formation de biofilm et de motilité ont été testées en présence des AHLs commerciales, afin de déterminer le rôle potentiel des AHLs chez les bactéries marines.

Puis le chapitre IV mettra en évidence la production de violacéine chez la souche *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 et sa régulation par des AHLs exogènes. Les AHLs exogènes ont également été testées sur la mobilité et la formation de biofilm de la bactérie. Ce chapitre comprendra un volet qui est présenté sous forme d'article (soumis à une revue ACS) et des résultats complémentaires à l'article.

Enfin, le cinquième chapitre (Chapitre V) présentera un premier criblage d'inhibiteurs commerciaux et synthétiques du QS en utilisant le biosenseur de référence *Chromobacterium*

violaceum 12472, mais aussi *P. ulvae* TC14 qui a l'avantage de pouvoir réagir avec différentes molécules ou extraits en conditions salines, se rapprochant plus de l'environnement marin.

En conclusion, cette étude met en évidence la multifonctionnalité de certaines molécules du QS telles que les AHLs et met en lumière la possibilité d'utiliser *P. ulvae* TC14 à plus long terme comme un biosenseur utilisable en conditions marines.

Chapitre II

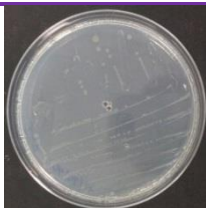
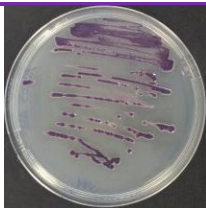


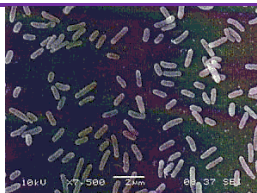
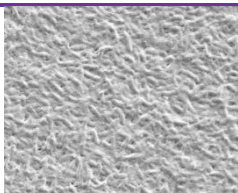
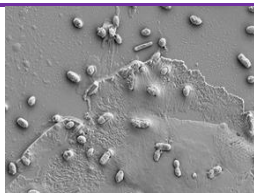
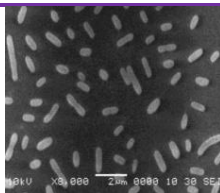
Matériel & Méthodes

1. Matériel

1.1. Souches marines

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est constitué de bactéries d'origine marine, isolées de la rade de Toulon, appartenant à la souche-tèque du laboratoire MAPIEM (Voir Tableau 9(Chapitre I)). Il s'agit de trois souches de la Toulon Collection appartenant toutes au genre *Pseudoalteromonas* : *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 et *Pseudoalteromonas* sp.TC15. En plus de celles-ci, une autre souche marine, *Paracoccus* sp. 4M6, isolée de l'Océan Atlantique et fournie par le laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de Lorient (LBCM), a été utilisée comme contrôle positif dans certains tests. Les différentes bactéries sont décrites dans le Tableau 11.

Tableau 11 Description des souches marines utilisées dans cette étude.

Dénomination	TC8	TC14	TC15	4M6
Taxonomie	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Paracoccus</i> sp.
coloration Gram	Bacille Gram négatif	Bacille Gram négatif	Bacille Gram négatif	Bacille Gram négatif
Morphologie	Petite colonie beige 1,5 mm x 1,5 mm	Petite colonie violette 1mmx 1mm	Colonie moyenne beige 3mm x 3mm	Petite colonie blanche 1,5 mm x 1,5 mm
Origine	Mourillon (Toulon)	Port militaire de Toulon	Port militaire de Toulon	Golfe du Morbihan
Support	silicone ELP08/55554/13	silicone fluoré ELP08/55554/13	silicone fluoré ELP08/5555/1	Verre
Image sur VNSS Agar				
Image MEB				
Références	(Camps <i>et al.</i> , 2011)	(Brian-Jaisson <i>et al.</i> , 2014)	(Brian-Jaisson <i>et al.</i> , 2014)	(Grasland <i>et al.</i> , 2003)

1.2. Biosenseurs

Les bactéries biosenseurs utilisées dans cette étude ont été fournies par le Professeur Robert McLean du département de biologie de l'Université de Texas (USA). Il s'agit des souches *Agrobacterium tumefaciens* A136 et son contrôle positif *Agrobacterium tumefaciens* KYC6, *Chromobacterium violaceum* CV026 et son contrôle positif *Chromobacterium violaceum* 31532 ainsi que la souche sauvage *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (Voir Tableau 12). Elles ont servi pour la détection des AHLs des souches marines et pour les tests d'inhibition du QS qui seront décrits plus en détails dans le sous chapitre 2 de ce chapitre, concernant les méthodes.

Tableau 12 Données relatives aux biosenseurs utilisés dans cette étude

Souche	Utilisation	Antibiotiques	Références
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 (pCF218) (pCF372; <i>lacZ</i>) (Souche mutante)	Produit de la β -galactosidase qui clive le chromogène X-Gal (coloration bleue), après détection de la 3-oxo-C ₈ -HSL intrinsèque et d'une large gamme d'AHLs (C ₁₀ -C ₁₄ -HSLs et 3-oxo-C ₄ à 3-oxo-C ₁₂ -HSL).	Spectinomycine (50 μ g/mL) et tétracycline (4,5 μ g/mL)	(Fuqua & Winans, 1996; Zhu <i>et al.</i> , 1998)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KYC6	Produit en grande quantité la 3-oxo-C ₈ -HSL et la C ₆ -HSL et la 3-oxo-C ₆ -HSL en faible quantité. Sert de contrôle positif dans les essais d'induction du QS avec A136.	Pas d'antibiotique	(Zhu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 (Souche mutante)	Produit de la violacéine, suite à la détection de la C ₆ -HSL exogène et des AHLs à chaîne latérale courte.	Pas d'antibiotique	(McClean <i>et al.</i> , 1997 ; Rumbaugh <i>et al.</i> , 2011a)
<i>Chromobacterium violaceum</i> 31532	Produit la C ₆ -HSL et sert de contrôle positif dans les essais d'induction du QS avec CV026.	Pas d'antibiotique	(McClean <i>et al.</i> , 1997)
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Produit de la violacéine à partir de la C ₆ -HSL intrinsèque. Est utilisé dans les tests d'inhibition du QS.	Pas d'antibiotique	(McLean <i>et al.</i> , 2004)

1.3 Cryoconservation des souches bactériennes

Toutes les souches bactériennes (marines et biosenseurs) ont été conservées par cryogénisation dans des cryotubes stériles de 1,8 mL (Thermo Scientific). Les cryotubes ont été préparés à partir de 750 μ L de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} \geq 0,6$) plus 750 μ L de glycérol stérile. Pour chaque souche bactérienne, plus d'un cryotube ont été préparés et conservés à -80°C .

1.4 Milieux de culture et solutions

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour réaliser cette étude. Il s'agit des milieux spécifiques aux bactéries marines et des milieux essentiellement utilisés pour la croissance des biosenseurs qui sont des souches terrestres.

1.4.1 Väätanen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar

Le milieu Väätanen Nine Salt Solution (VNSS) a été utilisé pour la croissance des bactéries marines. C'est un milieu non commercial, donc préparé directement au laboratoire à partir des différents réactifs présentés dans la Tableau 13. Sa préparation se fait en deux phases comme l'indique le Tableau 13. D'abord, la préparation du NSS à partir de neuf sels, puis celle du VNSS par ajout des éléments organiques au NSS (Mardén *et al.*, 1985b).

Après ajout de l'amidon, le milieu devient trouble et il s'avère nécessaire de le porter à ébullition jusqu'à ce qu'il devienne limpide. Son pH après autoclavage est de 7,6.

Le VNSS agar (VNSSA) quant à lui a été obtenu par ajout de 1,5% (p/v) d'agar (Sigma Aldrich, France). Dans cette étude, le milieu VNSS a été utilisé pour les cultures planctoniques et sessiles des souches marines.

Tableau 13 Composition chimique du milieu VNSS

Réactifs	Quantité (g/L)
Préparation du NSS	
NaCl	17,60
Na ₂ SO ₄	1,47
NaHCO ₃	0,008
KCl	0,25
KBr	0,040
MgCl ₂ 6 H ₂ O	1,87
CaCl ₂	0,31
SrCl ₂	0,01
H ₃ BO ₃	0,01
Préparation du VNSS	
Peptone	1,00
Extrait de levure	0,50
Glucose	0,50
Amidon	0,50
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,01

1.4.2 Marine broth (MB) et Marine agar (MA)

Le milieu Marine Broth (MB) (Becton, Dickson and company) est aussi un milieu spécifique aux bactéries marines. Certaines bactéries marines de notre laboratoire exigent ce milieu pour leur croissance. C'est un milieu plutôt délicat à la préparation, car après autoclavage, il a tendance à devenir turbide. Pour y remédier, il faut le filtrer sur une membrane de 0,2 µm (PVDF, Millipore), ce qui risque toutefois de modifier sa composition chimique finale (Tableau 14). Son pH après autoclavage est de 7,6.

Le milieu Marine agar (MA) (Becton, Dickson and company) est le dérivé gélosé du MB. Sa composition diffère de celle du MB seulement dans la concentration de l'élément MgCl₂ (8,8 g/L au lieu de 5,9 g/L) et aussi par la présence de l'agar (1,5%) (p/v).

Tableau 14 Composition chimique du milieu MB.

Réactifs	Quantité (g/L)
Peptone	5,00
Yeast extract	1,00
NaCl	19,45
Na ₂ SO ₄	3,24
Na ₂ CO ₃	0,16
KCl	0,55
KBr	0,08
MgCl ₂	5,90
CaCl ₂	1,80
SrCl ₂	0,034
H ₃ BO ₃	0,022
C ₆ H ₅ FeO ₇	0,10
NaF	0,0024
(NH ₄)NO ₃	0,0016
Na ₂ HPO ₄	0,008
Na ₂ SiO ₃	0,004

1.4.3 Sea Salt (SS)

Le Sea Salt (Sigma Aldrich, St Quentin, France) ou eau de mer artificielle (artificial sea water ou ASW) est une solution dépourvue de source de sucre et de carbone organique. Sa composition permet de maintenir les bactéries marines dans des conditions proches de celles de l'eau de mer. Il a été utilisé pour induire un état de «stress» nutritif chez les bactéries marines, afin de favoriser l'adhésion et la formation d'un biofilm *in vitro*. Après autoclavage, il devient trouble, d'où la nécessité de le filtrer à travers une membrane de 0,2 µm. Il contient les éléments chimiques décrits dans le Tableau 15.

Tableau 15 Composition chimique du *Sea Salt* (Sigma Aldrich)

Réactifs	Quantité (mg/L)
Cl	19290,0
Na	10780,0
SO ₄	2660,0
Mg	1320,0
K	420,0
Ca	450,0
HCO ₃	200,0
Sr	8,80
Br	56,0
B	5,60
I	0,24
Li	0,30
Elément trace	0,50

1.4.4 *Luria Bertani broth (LB) ou LB agar*

Le milieu LB (Sigma Aldrich, France) est un milieu nutritif commercial, généralement utilisé pour la croissance des souches non marines ou pathogènes. C'est un milieu non tamponné qui a un pH de 7,2 après autoclavage. Dans cette étude, il a servi à faire pousser tous les biosenseurs. Afin de maintenir stable le pH, le milieu LB a dans certains cas été tamponné à l'aide du tampon acide 4-morpholinepropanesulfonique (MOPS) (Fisher Bioreagents). Sa composition chimique très simple est reportée dans le Tableau 16.

Tableau 16 Composition chimique du LB

Réactifs	Quantité (g/L)
NaCl	5,0
Tryptone	10,0
Extrait de levure	5,0

1.4.5 *Tampon PBS*

Le PBS est une solution tampon phosphate saline qui sert de façon générale à rincer les cellules, afin d'enlever les traces de milieu avant tout traitement. Dans cette étude, il a servi aux lavages des biofilms des bactéries marines au cours des récoltes de biofilms. Pour la composition chimique voir Tableau 17. Son pH après autoclavage est de 7,4.

Tableau 17 Composition chimique du tampon PBS

Réactifs	Quantité (g/L)
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

1.5 Conditions de stérilité du matériel

Selon l'utilisation, les milieux de culture ont été soit stérilisés à l'autoclave (Appareil à Couvercle Amovible à Fermeture Rapide, Systec, 5050 MLV) selon le cycle de stérilisation 120°C pendant 20 min, soit filtrés à travers une membrane de filtration 0,2 µm (PVDF, Millipore). Les autres matériels qui ont servi dans les expériences microbiologiques (cônes, flacons, erlenmeyers tube eppendorf...) ont été stérilisés à l'autoclave selon le cycle de stérilisation 134°C pendant 7 min. Toutes les expériences microbiologiques ont été réalisées dans des postes de sécurité microbiologiques (PSM).

1.6 Préparation des réactifs et antibiotiques

Plusieurs réactifs ont servi à mener cette étude.

- X-gal

Le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (VWR, France) est un galactoside qui a été utilisé comme réactif dans les bio-essais avec *A. tumefaciens* A136. C'est le substrat chromogène de la β-galactosidase (produit du gène *lacZ*) qui devient bleu lorsqu'il est clivé par l'enzyme. Il a été dissout dans du DMF (Diméthylformamide) (AcrosOrganics) à une concentration de 20 mg/mL.

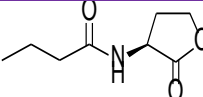
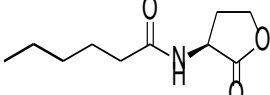
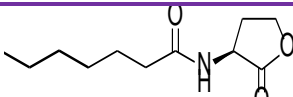
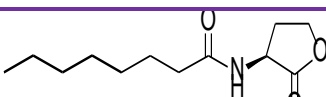
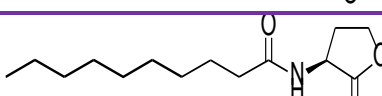
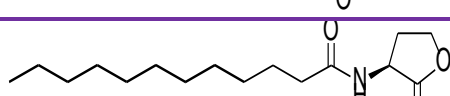
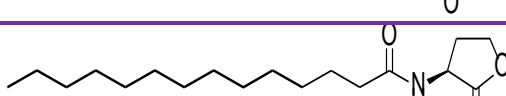
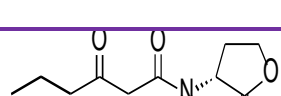
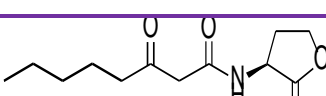
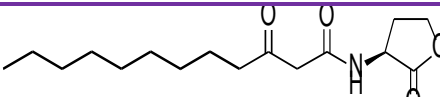
- Antibiotiques

La tétracycline et la spectinomycine (Sigma Aldrich) ont été préparées respectivement à 5 mg/mL et à 10 mg/mL, dans de l'éthanol absolu (VWR) et dans de l'eau distillée stérile. Ils ont servi à la mise en culture d'*A. tumefaciens* A136 dans le but de maintenir ses plasmides.

- AHLs standards

Les molécules commerciales d'AHLs ou AHLs standards utilisées dans cette étude ont été répertoriées dans le tableau 18. Il s'agit d'abord de la *N*-butyryl-*L*-homoserine lactone (C₄-HSL), et de la *N*-hexanoyl-*L*-homoserine lactone (C₆-HSL) (Cayman Chemical), mais aussi de la *N*-heptanoyl-*L*-homoserine lactone (C₇-HSL), la *N*-octanoyl-*L*-homoserine lactone (C₈-HSL), la *N*-decanoyl-*L*-homoserine lactone (C₁₀-HSL), la *N*-dodecanoyl-*L*-homoserine lactone (C₁₂-HSL), la *N*-tetradecanoyl-*L*-homoserine lactone (C₁₄-HSL), la *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C₆-HSL), la *N*-(3-oxooctanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C₈-HSL) et la *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Sigma Aldrich). Selon les expérimentations, elles ont été préparées soit à 1 mg/mL dans du méthanol (VWR), soit à 5 mM en solutions stocks, resuspendues avec du milieu de culture et 10% de DMSO

Tableau 18 Données relatives aux molécules standards AHLs utilisées pour réaliser cette étude.

Noms	Abréviation	Masse	Schéma
<i>N</i> -butyryl- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₄ -HSL ou BHL	171	
<i>N</i> -hexanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₆ -HSL ou HHL	199	
<i>N</i> -heptanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₇ -HSL; HpHL	213	
<i>N</i> -octanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₈ -HSL ou OHL	227	
<i>N</i> -décanyol- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₁₀ -HSL ou DHL	255	
<i>N</i> -dodécanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₁₂ -HSL ou dDHL	283	
<i>N</i> -tétradécanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone	C ₁₄ -HSL ou tDHL	311	
<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone	3-oxo-C ₆ -HSL ou OHHL	213	
<i>N</i> -(3-oxooctanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone	3-oxo-C ₈ -HSL ou OOHL	241	
<i>N</i> -(3-oxododecanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone	3-oxo-C ₁₂ -HSL ou OdDHL	297	

2 Méthodes

2.1 Culture en conditions planctoniques des bactéries

Toutes les cultures de bactéries ont démarré par un isolement à partir des cryotubes sur un milieu gélosé en boîtes de Pétri (VNSSA, MBA ou LBA), en fonction des types de bactéries et des expériences. Selon le volume final désiré, les cultures ont été réalisées comme suit : soit 10 mL de culture dans un flacon de 60 mL, soit 20 mL ou 50 mL respectivement dans des erlenmeyers de 100 et 250 mL afin de préserver les conditions d'oxygénation.

2.1.1 Souches marines

Les précultures des bactéries ont été réalisées à partir d'une colonie bien isolée de bactérie sur boîte de Pétri, dans 5 mL de milieu VNSS ou MB stérile dans un flacon de 30 mL préalablement stérilisé. Les précultures ont été incubées sur la nuit à 20°C sous agitation à 120 rpm, afin de revitaliser les cellules. A partir de la préculture, une culture proprement dite de 10 mL a été réalisée dans un flacon de 60 mL par dilution de la préculture de manière à obtenir une absorbance à 600 nm égale à 0,1 ($DO_{600nm} = 0,1$). La culture a été ensuite incubée à 20°C sous agitation 120 rpm jusqu'à la phase post exponentielle de croissance, soit en début de phase stationnaire, phase propice à la production de molécules du QS (Lazazzera, 2000a) telles que les AHLs (Fuqua *et al.*, 1994) et les quinolones (Diggle *et al.*, 2003).

2.1.2 Biosenseurs

Tout comme les bactéries marines, la culture des biosenseurs a aussi été initiée par un isolement sur milieu gélosé suivie d'une préculture, puis d'une culture jusqu'en début de phase stationnaire. Elle a été faite dans du milieu LB tamponné avec du MOPS pour les souches de *Chromobacterium* et l'incubation a été faite à 30°C sous 200 rpm d'agitation pendant 24h. La culture de la souche mutante d'*Agrobacterium*, *A. tumefaciens* A136 a nécessité l'ajout d'antibiotiques dont la spectinomycine (50 µg/mL) et la tétracycline (4,5 µg/mL) au milieu LB.

2.1.3 Suivi de croissance des bactéries marines sur 24 heures

Afin de déterminer le temps nécessaire à chaque bactérie marine pour atteindre la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire de croissance, un suivi de croissance a été effectué sur 24h. Ainsi, 50 mL de culture de bactérie à $DO_{600nm} = 0,1$ ont été préparés dans du VNSS contenu dans des erlenmeyers de 250 mL et incubés à 20°C. Toutes les heures pendant 24h, l'absorbance à 600 nm a été mesurée manuellement au spectrophotomètre à UV visible (Thermo Scientific, Genesys 20). Trois réplicats ont été réalisés pour chaque bactérie. Après quoi, une courbe de l'absorbance à 600 nm en fonction du temps a été tracée pour les bactéries TC8, TC14 et TC15.

2.2 Culture en conditions sessiles des souches

La culture en conditions sessiles a été réalisée uniquement pour la souche *P. ulvae* TC14. Elle a été faite en boîte de Pétri de polystyrène selon un protocole mis au point dans le laboratoire pour la culture des bactéries en biofilms. Les boîtes de Pétri ont étéensemencées avec 10 mL de culture de TC14 en VNSS ou en MB, ajustée à $DO_{600nm} = 0,1$. Elles ont été ensuite incubées à 20°C sans agitation afin de permettre la formation de biofilm. Après 48h d'incubation, 10 mL de milieu frais ont été ajoutés dans chaque boîte de Pétri, dans le but d'éviter la carence en nutriments des cellules. Après un total de 72h d'incubation, le milieu de culture a été retiré et le biofilm adhérent au fond de la boîte (et celui présent à l'interface air/liquide) a été gratté à l'aide de râteau comme le montre la Figure 19, puis repris dans 5 mL de tampon PBS dans chaque boîte de Pétri.



Figure 19 Image du grattage de biofilm après culture en conditions sessiles

2.3 Extraction des AHLs

Les AHLs ont été extraites aussi bien chez les bactéries marines que chez les biosenseurs *A. tumefaciens* KYC6 et *C. violaceum* 31532 en conditions de cultures planctoniques. L'extraction a été réalisée selon un protocole adapté à ceux de Morin *et al.* en 2003 et de Gardères *et al.* en 2012. Cinquante millilitres de culture de bactérie marine ou de biosenseurs en début de phase stationnaire ont été centrifugés (Sigma, 3-K30) dans des tubes à Téflon à 3000 g (soit 5735 rpm) pendant 10 min à une température de 4°C. Le surnageant de culture a été extrait trois fois avec 50 mL de dichlorométhane ou de chloroforme (Fisher Scientific, France). Les phases organiques combinées (150 mL) ont été séchées avec du sulfate de magnésium anhydre (Sigma-Aldrich), filtrées puis évaporées à l'évaporateur rotatif (Rotavapor) à 40°C. L'extrait sec obtenu a été dissout dans 1 mL de méthanol HPLC-grade (VWR, France), puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Le protocole d'extraction des AHLs est illustré dans la Figure 20. Lorsque l'extraction a été effectuée avec de l'acétate d'éthyle, celui-ci a été acidifié à 0,1% avec une solution acide.

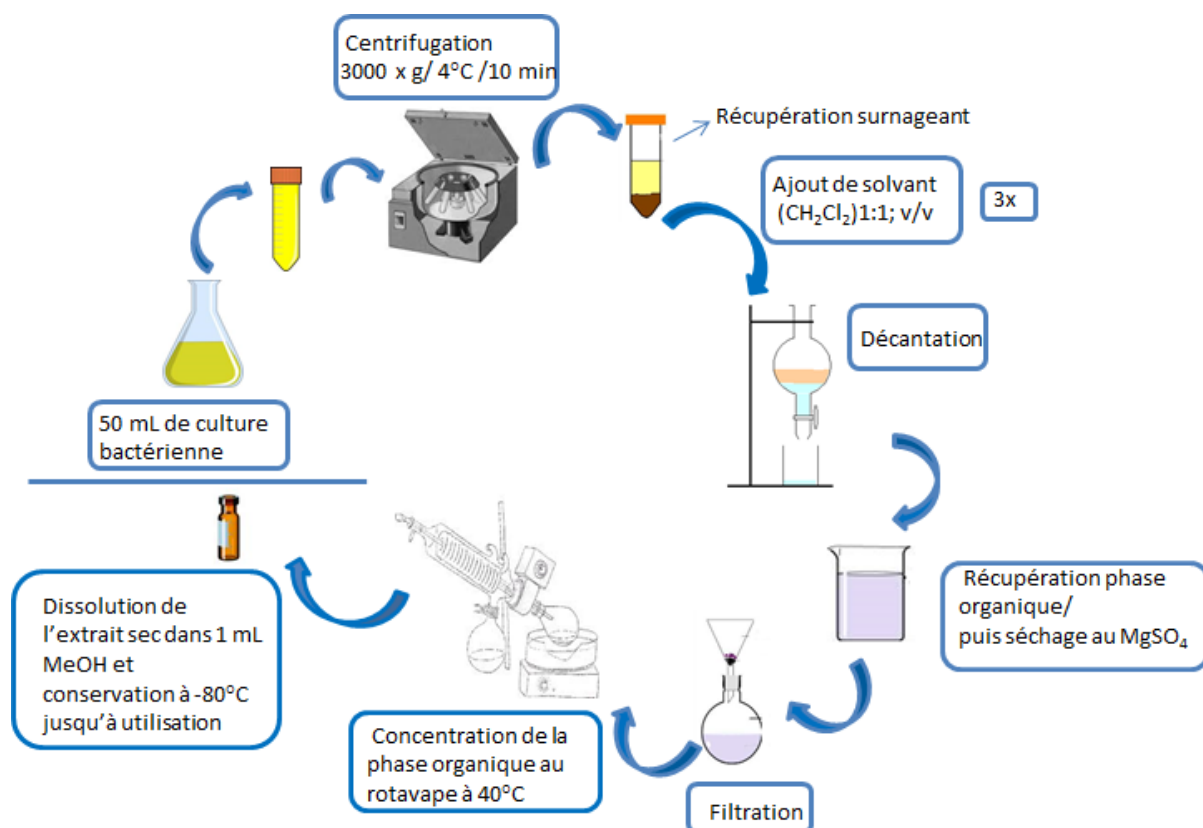


Figure 20 Représentation schématique du protocole d'extraction des AHLs à partir de solvants organiques.

2.4 Détection des AHLs des bactéries marines

La détection des AHLs a consisté en la mise en évidence de la production d'AHLs par les bactéries d'intérêt, à savoir les souches marines TC8, TC14 et TC15 et 4M6. Plusieurs méthodes ont été testées pour la détection des AHLs. Il s'agit de différentes méthodes utilisant les biosenseurs ainsi qu'une analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse.

2.4.1 Mise en évidence par les biosenseurs

L'utilisation des biosenseurs est une approche sensible et très répandue pour la détection des AHLs produites par des organismes et peut être faite de différentes façons. Pour chacune de ces méthodes, les essais *A. tumefaciens* A136 vs *A. tumefaciens* KYC6 et *C. violaceum* CV026 vs *C. violaceum* 31532 ont servi de contrôles positifs.

- 1^{ère} méthode : Stries en T- sur boîte VNSS agar

Cette méthode a consisté à faire des stries en forme de T de la bactérie marine à tester et du biosenseur sur une boîte de Pétri, à une distance d'à peu près 5 mm. Si la bactérie marine produit une AHL pouvant être reconnue par le biosenseur, celle-ci pourra diffuser à travers la gélose et activer le QS du biosenseur. Cela doit se traduire par un changement phénotypique visible du biosenseur, qui dans le cas de *C. violaceum* CV026 est la production de violacéine, colorant les colonies en violet et dans le cas d'*A. tumefaciens* A136 est la présence de colonies bleues après hydrolyse du X-gal par la β -galactosidase. Le milieu de culture utilisé dans cet essai a été le VNSS agar. Les essais avec A136 ont donc nécessité l'ajout du X-gal à 50 mg/mL. Les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 20°C pendant 24h. La méthode est illustrée par la Figure 21.

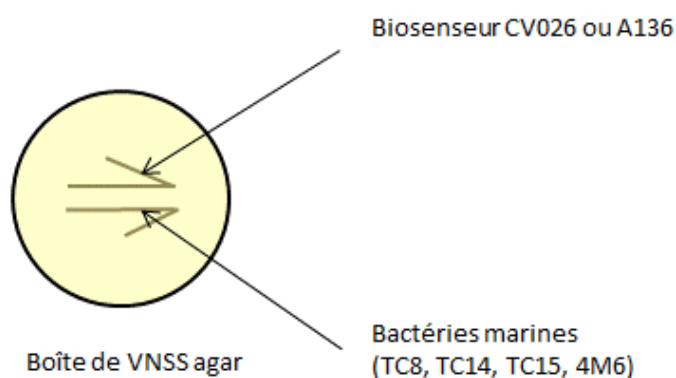


Figure 21 Stries en T croisées entre bactéries marines et biosenseurs sur gélose VNSS.

- 2^{ème} méthode : Culture séparée des biosenseurs et des bactéries marines

C'est une méthode qui consiste à faire pousser chaque type de bactéries sur son milieu de culture habituel et à les mettre ensemble lorsqu'elles se sont correctement développées. Elle est généralement utilisée quand la bactérie test et le biosenseur ne croient pas sur le même milieu de culture ou n'ont pas la même vitesse de croissance. Le protocole utilisé a été décrit par (Huang *et al.*, 2009). Ainsi donc, les biosenseurs ont été cultivés à 30°C sur des boîtes de Pétri contenant la gélose LB supplémentées d'antibiotiques si nécessaire. Parallèlement, les bactéries marines ont été cultivées à 20°C sur une gélose VNSS contenu dans de petites boîtes de Pétri (50 mm de diamètre) (voir Figure 22). Après 24h d'incubation, les petites boîtes de Pétri ont été renversées dans les grandes boîtes, de sorte à ce que la partie de la gélose où ont poussé les bactéries marines soit en contact direct avec le milieu LB sur lequel a poussé le biosenseur, afin de favoriser la diffusion d'éventuelles AHLs à travers les deux géloses ; les deux types de bactéries devant être séparés de 1 cm au plus. Les boîtes (l'une sur l'autre) ont été ensuite incubées à 20°C, température des bactéries marines pendant 24h.

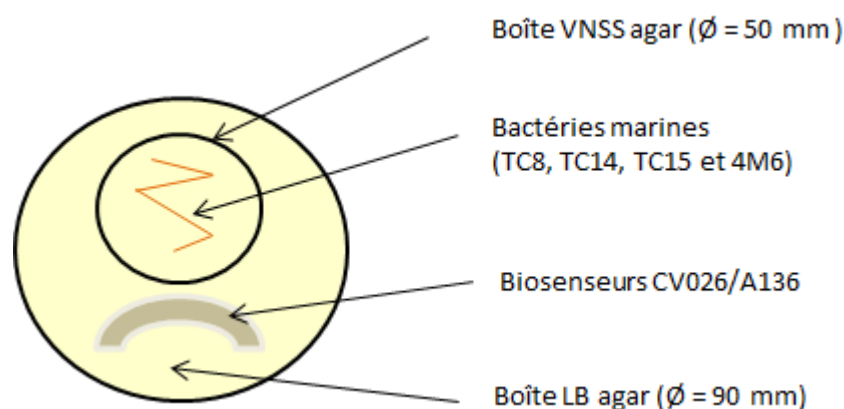


Figure 22 Technique de détection des AHLs à partir de deux géloses séparées

- 3^{ème} méthode: Chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est une technique qui permet dans un premier temps de séparer les molécules d'un extrait organique de bactéries par chromatographie sur couche mince et ensuite, de mettre les molécules semi purifiées sur la plaque chromatographique directement en contact avec les biosenseurs. Elle a été réalisée selon le protocole décrit par (Shaw *et al.*, 1997). Un volume de 2 µL d'extrait organique des bactéries (marines et biosenseurs) a été appliqué sur une plaque

chromatographique C18 en phase inverse (TLC Silica gel 60 RP-18, MerckKGaA, Darmstadt, Germany) et la chromatographie a été réalisée dans 200 mL d'un mélange de solvants méthanol/eau (60 : 40, v/v). Après le développement de la chromatographie (soit environ 2h), la plaque a été séchée sous la hotte. Parallèlement, 5 mL de culture sur la nuit de biosenseurs (A136 ou CV026) ont été ajoutés à 45 mL de LB stérile. La suspension obtenue a été incubée à 30°C jusqu'en phase exponentielle de croissance (soit environ 6h). L'intégralité des 50 mL de culture a été ajoutée à 100 mL de LB en surfusion contenant 1,12 g d'agar plus 50 µg/mL de X-gal pour les essais avec A136. Après cela, la plaque de chromatographie préalablement chauffée pendant 5 min a été déposée dans une boîte de Pétri de grande taille (200 mm de diamètre), puis recouverte avec 150 mL de culture de biosenseur contenant l'agar, de sorte à éviter les bulles. La plaque a alors été incubée à 30°C pendant 16 à 18h (Voir Figure 23).



Figure 23 Détection des AHLs par recouvrement de la plaque de CCM par une culture de biosenseurs

- 4^{ème} méthode: Détection des AHLs par les biosenseurs à partir des extraits de bactéries

C'est une technique qui s'apparente presque à celle décrite dans la première méthode, sauf qu'en lieu et place des bactéries vivantes, ce sont plutôt leurs extraits organiques qui sont directement mis en contact avec les biosenseurs. Ainsi, 10 µl d'extraits méthanoliques de surnageants de bactéries ont été déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant de la gélose LB. Après évaporation du méthanol sous le PSM, la gélose a étéensemencée en forme circulaire avec une culture de biosenseurs en fin de phase exponentielle de croissance (Figure 24). La boîte a ensuite été incubée à 30°C, température optimale de croissance des biosenseurs pendant 24 à 48h.

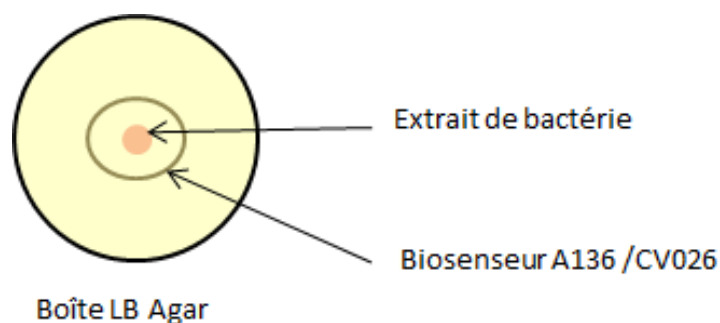


Figure 24 Détection des AHLs dans les extraits de bactéries marines par les biosenseurs.

2.4.2 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Une autre approche pour détecter la production d'AHLs chez les bactéries marines d'intérêt a été l'analyse spectrale par chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à la spectrométrie de masse. C'est une technique moins sensible que celle utilisant les biosenseurs car elle exige beaucoup de masse de matériel (de l'ordre du micro au milligramme), mais cependant est plus générale car elle permet la détection d'une large gamme d'AHLs. La HPLC permet de séparer les différentes molécules contenues dans un échantillon en fonction de leur polarité.

Les analyses ont été réalisées avec un système chromatographique (VWR-Hitachi) composé d'une pompe quaternaire L-2130, équipée d'un dégazeur en ligne, d'un injecteur automatique L-2200, disposant d'un système d'injection à volume variable et d'un four L-2300 dont la température est fixée à 30°C. Les séparations ont été effectuées par injection en phase inverse sur une colonne analytique (MerckPurospher STAR RP18, 5 μ m, 125 \times 4mm).

Le système chromatographique est équipé d'une triple détection :

- un spectromètre de masse (Bruker, Esquire 6000) à ionisation par électronébulisation (*Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry*, ESI-MS), équipé d'une trappe à ions (IT). Les conditions opératoires du spectromètre de masse sont les suivantes : température de séchage : 350°C, voltage du capillaire : 4000 V, pression du nébuliseur : 3,45 bars, gaz de séchage : hélium à un débit de 12 L/min, trappe à ions en mode *Full scan* de m/z 50 à 1200, avec un temps maximum de remplissage de 200 ms. Son principe est de déterminer la masse molaire d'un composé, grâce à l'étude de son pic moléculaire et l'obtention d'informations sur ses caractéristiques structurales, par analyse de la fragmentation.

- un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL, Eurosep, Chromachem), dont la température de nébulisation est fixée à 30°C et celle d'évaporation à 50°C. La pression en gaz de séchage (N₂) est de 1,5 bar.
- un détecteur UV-Visible à barrettes de photodiodes (VWR-Hitachi, L-2455) dans le domaine spectral 190-700 nm. Il donne des informations sur certains éléments structuraux des molécules qui absorbent de l'énergie.

Les solvants organiques qui ont servi dans ces travaux ont tous été de gradient HPLC (VWR ou Sigma-Aldrich).

L'analyse structurale a débuté avec les standards AHLs au préalable dissouts dans du méthanol à 1 mg/mL, afin de déterminer leur temps de rétention. Après quoi, les extraits organiques des bactéries marines ont été analysés.

2.4.2.1 *Analyse LC/MS des standards AHLs*

Vingt-cinq microlitres (25 µl) de solution d'AHLs ont été injectés dans la colonne de chromatographie à un débit de 0,5 mL/min. L'élution a été effectuée en utilisant une programmation binaire d'eau et d'acétonitrile (MeCN) acidifiés avec 0,1% d'acide formique de la manière suivante : (i) un palier isocratique initial de 10 min avec 10% de MeCN dans l'eau (v/v), (ii) un gradient linéaire conduisant à 100% de MeCN en 30 min, (iii) un palier isocratique final de 10 min avec 100% de MeCN et (iv) retour aux conditions initiales (1 min) et équilibrage de la colonne (5 min).

Le pic moléculaire de chaque standard, correspondant à sa masse molaire est déterminé par le premier détecteur de masse (MS) et la fragmentation est donnée par un second détecteur de masse (MS₂).

2.4.2.2 *Optimisation des conditions de la LC/MS*

Après analyse des standards AHLs de façon individuelle, il s'est avéré opportun d'optimiser les conditions de séparation et la détection limite d'un mélange de standards AHLs, dans le but d'améliorer les analyses des extraits de bactéries. Pour cela, 25 µL d'un mélange de sept AHLs à chaînes non substituées dont la C₄-HSL, la C₆-HSL, la C₇-HSL, la C₈-HSL, la C₁₀-HSL, la C₁₂-HSL et la C₁₄-HSL ont été injectés dans la colonne chromatographique. Les éléments ciblés dans cette optimisation ont été (i) la longueur d'onde maximale de l'UV visible, (ii) les paramètres du détecteur ELSD, (iii) la modification des paramètres du spectromètre de masse, afin d'obtenir une intensité maximale.

2.4.2.3 Analyse LC/MS des extraits de bactéries

Les extraits méthanoliques des bactéries marines TC8, TC14, TC15 et 4M6 obtenus comme décrits précédemment ont été analysés en LC/MS à la suite des standards, dans les mêmes conditions d'élution, afin d'y détecter la présence d'éventuelles AHLs. Les fragments d'ion caractéristique m/z 102, dérivés du groupement lactone ont été recherchés dans le spectromètre de masse pour chaque extrait. Les extraits des biosenseurs *A. tumefaciens* KYC6 et *C. violaceum* 31532, censés contenir respectivement la 3-oxo-C₈-HSL et la C₆-HSL, ont été utilisés en guise de témoins positifs.

2.5 Tests biologiques avec les AHLs exogènes

Les tests biologiques réalisés ont consisté à tester l'effet des AHLs commerciales sur l'adhésion et la mobilité par swimming, swarming et twitching des bactéries marines.

2.5.1 Effet des AHLs standards sur l'adhésion des bactéries marines

Toutes les AHLs standards disponibles dans le laboratoire ont été testées sur l'adhésion des bactéries marines suivantes : TC8, TC14 et 4M6. Ces bactéries ont déjà été décrites pour avoir une bonne capacité d'adhésion sur du polystyrène (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Grasland *et al.*, 2003).

2.5.1.1 Principe du test d'adhésion

Le principe de ce test est de mettre en contact les molécules AHLs standards avec les bactéries cibles afin d'évaluer leur capacité à favoriser ou à inhiber l'attachement des bactéries au polystyrène.

2.5.1.2 Protocole du test d'adhésion

Le protocole utilisé pour réaliser le test d'adhésion a été adapté à partir du protocole du test anti adhésion, mis au point par (Camps *et al.*, 2011) et réalisé au cours la thèse d'Othmani en 2014, avec la différence que les molécules testées dans ce cas-ci sont des AHLs commerciales.

- Préparation des AHLs

Les AHLs ont été préalablement solubilisées dans du DMSO, de sorte à obtenir une concentration stock de 10 mM, puis diluées dans l'ASW, pour atteindre les concentrations de 10, 100, 200 et 400 μ M.

- Préparation des bactéries

Les bactéries ont été au préalable mises en culture dans du VNSS liquide à 20°C sous agitation 120 rpm jusqu'en début de phase stationnaire. Les cultures ont été ensuite centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min. Ensuite, le milieu VNSS a été retiré et remplacé par l'ASW, de sorte à obtenir une concentration bactérienne finale égale à 0,8 ($DO_{600nm} = 0,8$). L'ASW permet de maintenir les bactéries en vie tout en limitant leur croissance, favorisant ainsi leur adhésion.

- Ensemencement des microplaques

Les microplaques noires (Fluoronunc F96), ont été utilisées pour réaliser le test d'adhésion des bactéries marines en présence des AHLs commerciales. Quatre AHLs ont été testées par microplaque, à quatre concentrations finales différentes (5, 50, 100 et 200 μ M). Les échantillons « tests » ont été réalisés en triplicats avec 100 μ L de solution d'AHL et 100 μ L d'inoculum bactérien. Comme échantillons « témoins », il a eu l'échantillon « blanc », aussi réalisé en triplicats, à partir de 100 μ L de solutions d'AHL et de 100 μ L d'ASW sans bactéries. L'objectif du « blanc » est de vérifier l'absence d'interaction entre les AHLs, le marqueur et l'ASW lors de la lecture en microplaque et d'éliminer le bruit de fond lié au marquage. D'autres types de témoins ont également été réalisés dans cette étude. Il s'agit (i) du témoin bactérien d'adhésion, constitué de bactéries seules sans AHL, réalisé en deux triplicats, à partir de 100 μ L d'inoculum bactérien plus 100 μ L d'ASW. Il sert de référence d'adhésion. (ii) le témoin solvant, réalisé en triplicats à partir de 100 μ L de DMSO et 100 μ L de suspension bactérienne. Il correspond au pourcentage maximal de solvant toléré par les bactéries et permet de vérifier qu'une éventuelle activité pro adhésion ou anti-adhésion observée ne soit pas liée à un effet du solvant.

Après ensemencement, la microplaque a été incubée à 20°C sous agitation 120 rpm pendant 15 à 24h.

Après la période d'incubation, les bactéries non-adhérées ont d'abord été retirées par retournement de la plaque. Ensuite les bactéries adhérentes ont subi trois lavages successifs avec une solution de NaCl à 36 g/L (200 μ L par puits), puis elles ont été marquées avec un

marqueur fluorescent de l'ADN, le SYTO® RED 61 à 1 µM. Par la suite, les microplaques ont été incubées à l'obscurité pendant 20 min. Après 20 min, le marqueur a été retiré par retournement de la plaque et un dernier lavage a été fait avec la solution de NaCl, suivi de la lecture de la fluorescence dans chaque puits à partir d'un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro) aux longueurs d'excitation λ_{ex} = 628 nm et d'émission λ_{em} = 645 nm.

Chaque essai a été réalisé en triplicat. Le pourcentage d'adhésion a été calculé selon la formule mathématique suivante :

$$\% \text{ adhésion} = (IFT - IFPdt) / (IFTB - IFBlc) \times 100$$

Avec:

*IF= Intensité de Fluorescence

*IFT = Moyenne des triplicats d'IF pour chaque concentration d'échantillon test (AHL testée) (AHL + bactéries + marqueur)

*IFPdt = Moyenne des triplicats d'IF des échantillons blancs (AHL+ marqueur sans bactéries)

*IFTB = Moyenne des six réplicats d'IF du témoin bactérien (Bactéries +marqueur)

*IFBlc = Moyenne des réplicats du blanc milieu (ASW + marqueur)

Un ratio d'adhésion (IFTB-IFBlc) supérieur ou égal à 2,5 a été choisi comme indicateur d'adhésion bactérienne.

2.5.2 Effet des AHLs standards sur la motilité des bactéries marines

Certaines AHLs ont été évaluées pour leur effet sur la mobilité de quelques-unes des bactéries marines. Le choix de ces AHLs pour la réalisation de ce test s'est fait en fonction des résultats obtenus pour d'autres types de bio-essais. Ceci sera détaillé dans les chapitres III et IV de ce manuscrit. Ainsi, la C₁₂-HSL a été testée sur le swimming, le swarming et le twitching de TC15, la C₆-HSL, la C₁₂-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL ont été testées sur le swimming et le swarming de TC14, la C₁₄-HSL et la 3-oxo-C₆-HSL, sur le swimming et le swarming de 4M6. Le principe de ces tests étant de vérifier si les AHLs, qu'elles soient intrinsèques ou exogènes auraient un effet inducteur ou inhibiteur sur les différents types de mobilité des bactéries.

2.5.2.1 *Swimming*

Le swimming est un mode de nage des bactéries en milieu liquide ou semi-solide. Il est dû à la présence de flagelles qui permet aux cellules de nager de façon individuelle (Figure 25). Le but est de vérifier l'effet des AHLs commerciales sur la mobilité par swimming des bactéries marines.

Pour cela, 10 mL de chaque bactérie testée ont été mis en culture dans un milieu liquide VNSS jusqu'en phase post exponentielle. Parallèlement, une gélose molle de VNSS a été préparée par ajout de 0,3% (m/v) d'agar. Les AHLs ont été rajoutées à une concentration finale de 50 μ M par incorporation dans la gélose, avant d'être coulée dans les boîtes de Pétri. Une fois les boîtes séchées, 5 μ L de culture de bactérie ont été déposée sous forme de goutte au centre de chaque boîte de Pétri. Un témoin sans AHL a été réalisé. Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C en conditions statiques. La mesure du diamètre des halos formés par les bactéries mobiles a été effectuée après 48h d'incubation. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

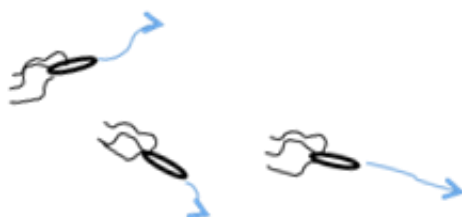


Figure 25 Représentation schématique du swimming.
Les bactéries nagent librement dans le milieu liquide grâce à leurs flagelles.

2.5.2.2 *Swarming*

Ce type de mobilité consiste en un déplacement en petits groupes de bactéries de manière organisée sur une surface solide et humide (Figure 26). Selon les espèces bactériennes, les bactéries immobiles ou immobilisées peuvent subir une transformation morphologique lors de laquelle elles s'allongent et peuvent présenter un ou plusieurs flagelles. Ces modifications leur permettent de coloniser rapidement de nouvelles surfaces, notamment au moment de l'essaimage du biofilm.

Pour le réaliser, 5 μ L d'une culture de bactérie en phase post exponentielle de croissance ont été déposés sous forme de goutte au centre d'une boîte de Pétri contenant une gélose VNSS solide avec 0,5% d'agar (m/v) à laquelle les AHLs ont été au préalable rajoutées

par incorporation, à une concentration finale de 50 μM . Un témoin sans AHL a été réalisé. La mesure du diamètre des halos formés par les bactéries mobiles a été faite après 48h d'incubation. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

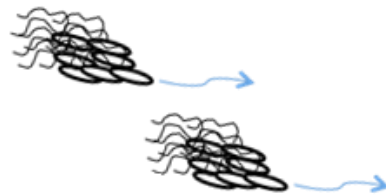


Figure 26 Représentation schématique du swarming
Les bactéries flagellées se déplacent en petits groupes.

2.5.2.3 *Twitching*

Ce mode de mobilité est lié à la présence de pili de type IV, qui en se rétractant peuvent participer à la mobilité, en permettant aux bactéries de se mouvoir par glissement en petits groupes sur une surface parfaitement solide (Figure 27).

Ainsi, 10 mL de culture bactérienne ont été réalisés en milieu VNSS liquide à 20°C sous agitation 120 rpm pour atteindre la phase post exponentielle. Une gélose solide, contenant 1,5% d'agar (m/v) incorporée avec les AHLs à 50 μM a été percée à l'aide d'un cône de 100 μL , précédemment trempé dans la culture bactérienne. Des boîtes de Pétri sans AHL ont servi de témoins. Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C sans agitation. Le halo de migration a été mesuré 48h après l'incubation. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.



Figure 27 Représentation schématique du twitching.
Les bactéries se déplacent par glissement en petits groupes sur une surface solide.

2.6 Etude de la violacéine de TC14

Parmi les bactéries marines étudiées, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 produit un pigment pourpre, caractéristique de la violacéine. Les étapes suivantes ont porté sur la caractérisation de ce pigment et l'éventuelle implication du QS dans sa production.

2.6.1 Extraction et dosage du pigment

L'extraction du pigment pourpre de TC14 a été réalisée suivant les protocoles décrits par Wang et *al.* (2008) et Lu et *al.* (2009).

Un millilitre de culture de bactéries en conditions planctoniques ou sessiles réalisée en milieux VNSS, MB ou LB a été centrifugé à 6000 g pendant 10 min, dans une mini-centrifugeuse (eppendorf, mini Spin). Après la centrifugation, le surnageant de culture a été rejeté, puis le culot bactérien a été resuspendu dans 1 mL d'éthanol absolu (Fischer, France). La suspension éthanolique obtenue a été soumise à une ultrasonication au bain à ultra-son (Branson), dans le but de lyser les cellules jusqu'à ce qu'elles deviennent complètement blanches (après environ 20 min). Après cela, l'extrait éthanolique a été séparé du culot par centrifugation à 10000 g pendant 20 min et l'absorbance du pigment violet a été mesurée à 575 nm au spectrophotomètre (Thermo Scientific, Genesys 20). Le protocole d'extraction et de dosage du pigment est illustré dans la Figure 28.

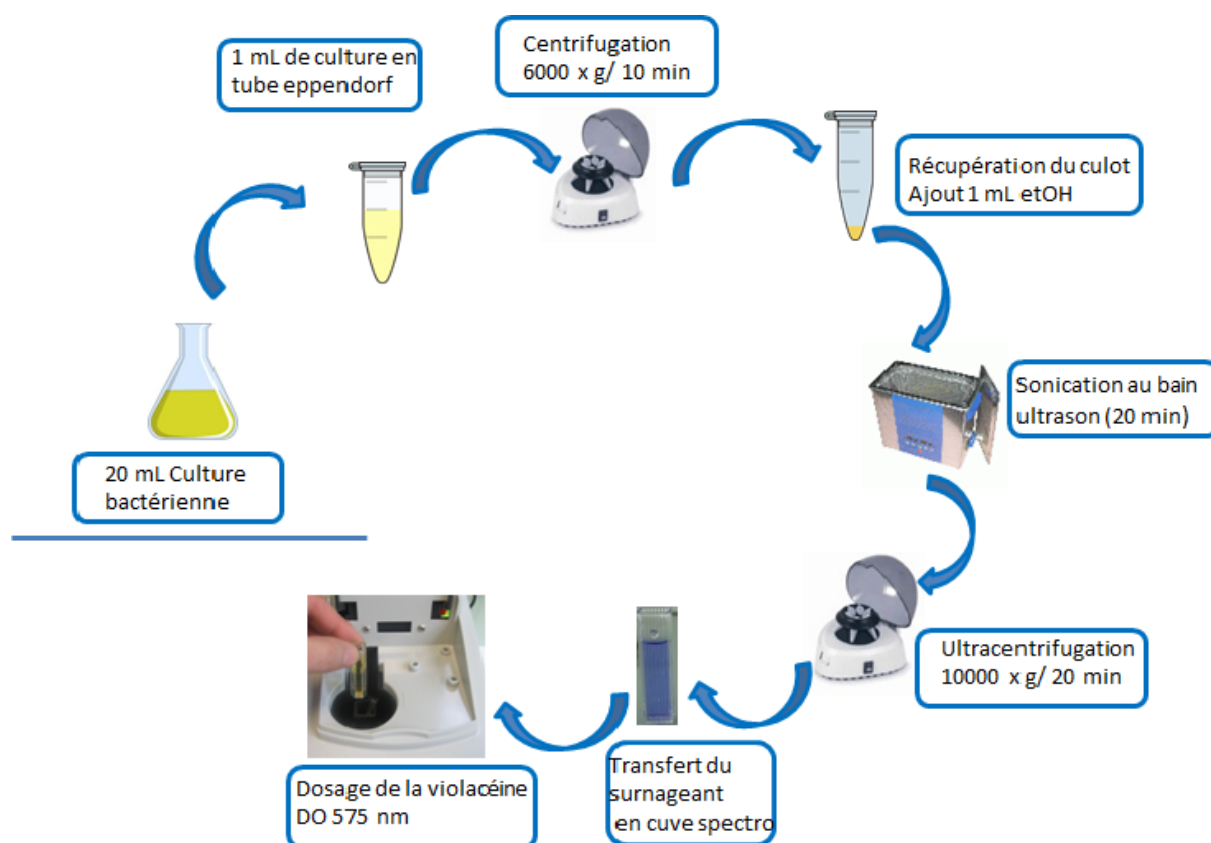


Figure 28 Représentation schématique du protocole d'extraction de la violacéine

2.6.2 Caractérisation de la violacéine par LC/DAD/MS

La violacéine présente dans l'extrait éthanolique de TC14, préalablement séchée et solubilisée dans du méthanol (HPLC grade) a été caractérisé par analyse LC/DAD/MS, sur le même système chromatographique déjà décrit (LaChrom Elite), équipé d'un détecteur DAD (L-2455; 190 à 700 nm) et un spectromètre de masse (Bruker, Esquire 6000 ESI-MS). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne analytique en phase inverse (Phenomenex, Gemini C₆-Phenyl, 4 µm, 250 × 3 mm), à un débit de 0,5 mL/min, maintenu à 30°C. L'élution a été effectuée en utilisant une programmation binaire d'eau et d'acétonitrile (acidifiés avec 0,1% d'acide formique), selon la séquence suivante : (i) palier isocratique initial de 5 min avec 10% d'acétonitrile dans l'eau (v/v), (ii) gradient linéaire conduisant de 10% à 100% d'acétonitrile en 30 min, (iii) palier isocratique final de 20 min avec 100% d'acétonitrile, (iv) retour aux conditions initiales et équilibrage de la colonne (10 min).

2.6.3 Cinétique de croissance et de production de la violacéine chez TC14

Afin de déterminer la période exacte à laquelle TC14 produit la violacéine au cours de sa croissance, il a été entrepris un suivi de croissance, couplé à un suivi de la production de violacéine dans deux milieux de culture différents, le VNSS et le MB. L'objectif est de comparer la quantité de violacéine produite lorsque la bactérie est en culture dans les deux milieux. Toutes les fois que la croissance bactérienne a été mesurée en parallèle avec la violacéine, elle a été faite à 700 nm au lieu 600 nm, dans le but de s'écarter au mieux de la longueur d'onde de mesure de violacéine (575 nm) comme cela a été fait par Wang et collaborateurs en 2008.

Pour cela, 50 mL de culture de TC14 à $DO_{700nm} = 0,1$ en MB et en VNSS ont été réalisés dans des erlenmeyers de 250 mL. Toutes les 24h, la croissance a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 700 nm et la quantité de violacéine produite a été déterminée par extraction suivie de la mesure de l'absorbance à 575 nm.

2.6.4 Effet des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14

Les AHLs commerciales déjà citées ont été évaluées pour leur effet sur la production de violacéine de TC14 en milieux VNSS et MB, en conditions planctoniques et sessiles.

2.6.4.1 En culture planctonique

Dans cette expérimentation, les AHLs exogènes ont été rajoutées à la concentration finale de 50 μ M dans 50 mL de cultures de TC14, réalisées en milieu VNSS ou MB dans des erlenmeyers 250 mL. En parallèle, une culture de TC14 sans AHLs a été réalisée pour servir de contrôle dans ce test. Toutes les 24h, la croissance a été évaluée par la lecture de l'absorbance à 700 nm et la quantité de violacéine produite a été déterminée par extraction de la violacéine suivie de la lecture de l'absorbance à 575 nm. L'expérience a été répétée trois fois indépendamment.

2.6.4.2 Effet de la concentration des AHLs

L'effet de la concentration de certaines AHLs exogènes a été évalué sur la production de violacéine de TC14. Les AHLs ont été rajoutées à différentes concentrations à 20 mL de culture de TC14 en conditions planctoniques, réalisées en VNSS. Le but est de vérifier

l'existence d'un éventuel effet dose. Les AHLs ont été testées à 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 et 50 μ M. Un témoin sans AHL a été réalisé. L'expérience a été répétée trois fois indépendamment.

2.6.4.3 *En culture sessile*

L'effet des AHLs exogènes a également été testé sur la production de violacéine de TC14 en conditions sessiles. La culture en biofilm a été effectuée comme précédemment décrit pour les cultures en conditions sessiles (voir § 2-2). Les AHLs ont été rajoutées à une culture de TC14 en VNSS ou MB, à une concentration finale de 50 μ M. Après la récolte du biofilm par grattage, la violacéine rattachée au biofilm et celle contenue dans le milieu de culture ont été séparément dosées après extraction. Le but était de vérifier si la production de violacéine était ou non augmentée en présence des molécules AHLs exogènes. Des boîtes de Pétri contenant la culture de TC14 sans AHLs ont été préparées en guise de témoins. L'expérience a été répétée trois fois indépendamment.

2.6.5 *Effet des extraits de bactéries sur la violacéine de TC14*

Dans ce cas, les extraits des bactéries marines suivantes : TC8, TC15, TC14 et 4M6 ainsi que les biosenseurs KYC6 et 31532 ont été testées sur la production de violacéine de TC14. Pour ce faire, une microplaque transparente vingt-quatre puits (Costar 3738, USA) a été inoculée avec 100 μ L d'extraits de bactéries dilués dans du VNSS avec 10% de DMSO, et 900 μ L de culture de bactéries ($DO_{700nm} = 0,1$) en VNSS. Des puits témoins ont été ensemencés avec 100 μ L de VNSS et 900 μ L de culture bactérienne. Les microplaques ont été ensuite incubées à 20°C pendant 24h, 48h et 72h, sous agitation 120 rpm dans une enceinte humide, à raison d'une microplaque par durée d'incubation. Aux temps indiqués, la croissance bactérienne et la violacéine ont été mesurées au spectrophotomètre respectivement à 700 et à 575 nm. Chaque essai a été effectué en triplicat et les triplicats de mesures ont été répétés trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2.6.6 *Effet de l'esculétine sur la violacéine de TC14*

L'esculétine, de son nom scientifique la 6, 7-dihydroxycoumarine est un dérivé coumarique (Figure 29) qui a été décrit dans la littérature comme étant un inhibiteur du QS

chez plusieurs bactéries dont *P. aeruginosa* (Zeng *et al.*, 2008) et *C. violaceum* (Brackman *et al.*, 2009).

Basé sur les tests d'inhibition de la production de violacéine chez *C. violaceum*, l'esculétine a été testée sur la production de violacéine de TC14. Pour cela, 20 mL de culture de TC14 à $DO_{700nm} = 0,1$ en VNSS, ont été traités en présence de différentes concentrations (50, 100, 200 et 500 μM) d'esculétine. Une culture de TC14 sans esculétine a été réalisée en guise de contrôle. Les cultures ont été incubées à 20°C sous agitation. Toutes les 24h pendant 72h, la croissance ainsi que la violacéine ont été mesurées respectivement à 700 et à 575 nm. L'expérience a été répétée trois fois indépendamment.

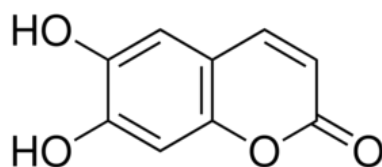


Figure 29 Structure chimique de l'esculétine (6, 7-dihydroxycoumarine).

2.7 Effet des AHLs exogènes sur la formation de biofilm de TC14

En parallèle de l'étude de l'effet des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14, une étude portant sur l'effet des AHLs exogènes sur la formation et la masse de biofilm de TC14 a été réalisée.

2.7.1 Masse de biofilm

P. ulvae TC14 a été cultivée en conditions sessiles en milieux VNSS et MB en présence ou non d'AHLs exogènes à 50 μM . Après 72h d'incubation, les biofilms formés au cours des différents traitements ont été collectés, lyophilisés (Thermo Electron Corporation Power Dry LL1500 Freezer Dryer), puis pesés. La masse de biofilm issue des différents traitements (culture en présence d'AHLs exogènes), exprimée en gramme a été comparée à celle du contrôle (culture sans AHLs exogènes). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicats.

2.7.2 Formation de biofilm: Biofilm Ring Test[®]

Une autre approche a été de vérifier l'effet des AHLs exogènes sur la formation de biofilm de TC14 à partir du Biofilm Ring Test[®] (BFRT[®]). Précédemment décrit dans le premier chapitre, le BFRT[®] est une méthode qui sert à évaluer la formation de biofilm des bactéries et à les quantifier. Il est basé sur la mobilité de microbilles magnétiques inertes, inoculées avec une culture bactérienne.

- Protocole du BFRT[®]

Le test a été réalisé comme décrit par Brian-Jaisson et *al.* en 2014. Une culture en phase post exponentielle de TC14, ajustée à $DO_{600nm} = 1$ a été diluée au 1/250^{ème} dans du milieu MB ou VNSS filtré contenant 0,004% (v/v) de Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich) et 10 µL/mL de solution de microbilles (TON006N). La solution bactérienne mélangée aux microbilles a été déposée au fond des puits d'une microplaque 96 puits (Biofilm Control[®]), préalablementensemencés avec une solution d'AHLs exogènes à une concentration finale de 50, 100 ou 200 µM, de sorte à obtenir un volume final de 200 µL dans chaque puits. Deux types de puits témoins ont été réalisés. Il s'agit (i) de puitsensemencés à partir du milieu stérile plus microbilles et de la solution d'AHLs sans bactéries et (ii) de puits contenant la suspension bactérienne sans ajout de solution d'AHLs. Après un certain temps d'incubation (soit 24, 48 et 72h) à 20°C sans agitation dans une chambre humide, la microplaque a été placée sur une plaque aimantée. L'analyse des résultats et l'acquisition des images des puits avant et après aimantation s'est fait via un scanner d'image et le logiciel BFC Elements[®].

En absence de formation de biofilm, les microbilles sous l'influence du champ magnétique migrent au centre du puits et forment un spot foncé visible à l'œil nu. Au contraire, si la culture bactérienne a formé un biofilm, les billes vont être piégées dans la matrice extracellulaire et ne migrent pas au centre du puits au cours de l'aimantation. Il n'y a donc pas de spot visible correspondant au regroupement des microbilles. Dans le cas d'un biofilm intermédiaire, la migration des microbilles est réduite, ce qui atténue la formation du spot. Dans ce cas, seul un halo sera visible (voir Figure 30).

Les résultats ont été exprimés en Index de Formation de Biofilm (BFI) avec :

$$\Delta BFI = BFI \text{ témoin} - BFI \text{ échantillon}$$

- Si le $\Delta BFI < 2$, il n'y a pas de formation de biofilm.

- Si $2 < \Delta BFI < 20$, le biofilm est en développement.
- $\Delta BFI > 20$, le biofilm est totalement formé, (biofilm mature).

Chaque expérience a été réalisée en triplicats, trois fois indépendamment.

L'ajout de tween 20 à 0,004% permet d'éviter les interactions entre les microbilles et les sels contenus dans les milieux de cultures pour bactéries marines (VNSS et MB).

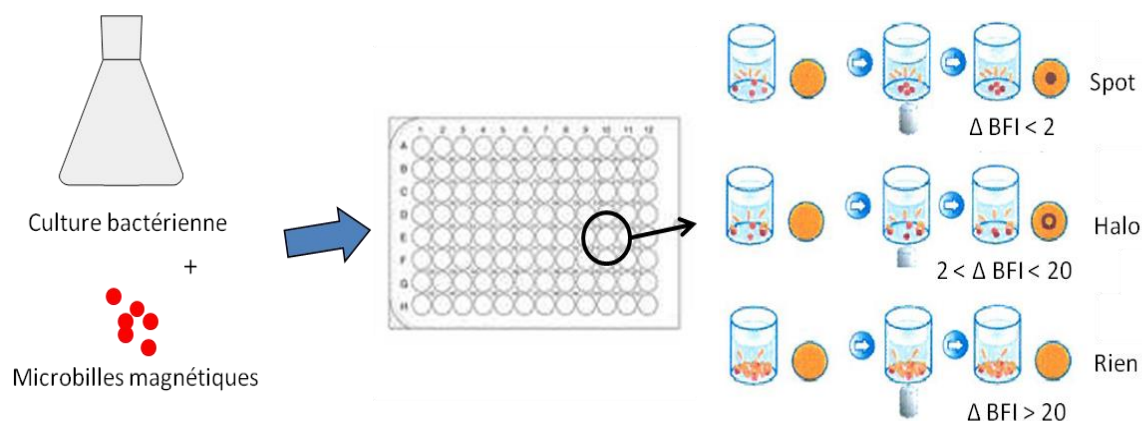


Figure 30 Représentation schématique du principe du test BFRT.

2.8 Tests préliminaires d'inhibition du QS (QSI)

2.8.1 Molécules testées

Des molécules commerciales, décrites dans la littérature pour avoir un effet anti-QS sur des bactéries cibles telles que *C. violaceum* CV026 ou 12472, *P. aeruginosa* et *E. coli*, ont été testées sur le QS de *C. violaceum* ATCC 12472 et sur la production de violacéine de TC14. Il s'agit du carvacrol ou cymophénol (abcr GmbH & Co. KG, Germany), de l'acide kojique (abcr GmbH & Co. KG, Germany), de la *p*-benzoquinone (Sigma-Aldrich) et de l'esculétine (Sigma-Aldrich) (Voir Tableau 19).

Des analogues synthétiques ont aussi été testés en anti-QS avec *C. violaceum* 12472 et *P. ulvae* TC14. Il s'agit d'analogues d'alcaloïdes imidazoliques (Linares *et al.*, 2011) et de bromotyramines (Schoenfeld *et al.*, 2002), synthétisées dans le laboratoire MAPIEM. Les analogues d'alcaloïdes imidazoliques d'origine marine (OB1 et OB2), ont précédemment montré un effet antiadhésif et antibiofilm sur les bactéries marines *Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Paracoccus* sp. 4M6 (Linares *et al.*, 2011). Les analogues de bromotyramines (AS59, AS76 et AS123) ont été synthétisés dans le cadre d'une thèse en cours dans le laboratoire

(Andjouh comm. pers.) pour être testés sur l'adhésion et la formation de biofilm de bactéries marines (Voir Tableau 20).

Tableau 19 Données relatives aux molécules commerciales testées en anti-QS.

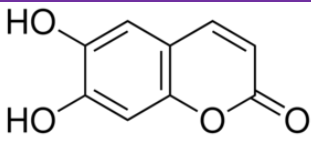
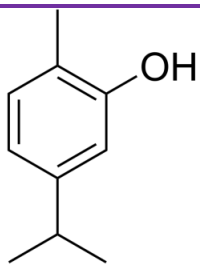
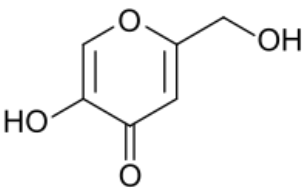
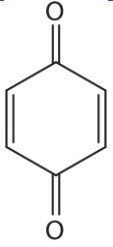
Nom	Nomenclature	Masse Molaire (g/mole)	Structure	Activité et Références
Esculétine	6, 7-dihydroxycoumarine	178,14		Molécule QSI chez <i>C. violaceum</i> CV026, <i>E. coli</i> JB523 (Brackman <i>et al.</i> , 2009) et <i>P. aeruginosa</i> (Zeng <i>et al.</i> , 2008)
Carvacrol	2-méthyle-5-(propan-2-yle) phénole	150,21		Molécule QSI chez <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 (Burt <i>et al.</i> , 2014) Inhibe la motilité et l'infection chez <i>C. jejuni</i> (van Alphen <i>et al.</i> , 2012)
Acide kojique	5-hydroxy-2-(hydroxyméthyle)-4-pyrone	142,12		Inhibe le QS de <i>C. violaceum</i> CV017 et d' <i>E. coli</i> DH5α Activité antibactérienne contre les bactéries et la diatomée <i>Amphora coffeaeformis</i> (Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)
<i>p</i> -Benzoquinone	1,4-benzoquinone	108,09		Inhibe le QS de <i>P. aeruginosa</i> (Rasmussen <i>et al.</i> , 2005) et d' <i>E. coli</i> (Brackman <i>et al.</i> , 2009)

Tableau 20 Données relatives aux molécules synthétiques testées en anti-QS.

Nom	Nomenclature	Masse Molaire (g/mole)	Structure	Activité et Références
OB1	1-(4-methoxybenzyl)-5-(3,5-dimethoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole	325		Inhibe l'adhésion de des souches D41 et 4M6 (Linares <i>et al.</i> , 2011)
OB2	Methyl 1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate	233		Inhibe l'adhésion de des souches D41 et 4M6 (Linares <i>et al.</i> , 2011)
AS59	1-(3-bromo-4-methoxybenzyl)-N-(4-hydroxyphenethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	214		Synthétisés dans le cadre de la thèse de Sofyane Andjouh
AS76	2-(2-bromo-4-(2-(4-methoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl) phenoxy)-N,N-dimethylethanamine	383		Synthétisés dans le cadre de la thèse de Sofyane Andjouh
AS123	(2-(2-bromo-4-(2-(4-methoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl) phenoxy) ethyl) guanidine	511		Synthétisés dans le cadre de la thèse de Sofyane Andjouh

OB: Olivier Bottezck

AS: Andjouh Sofyane

2.8.2 Tests QSI

Le test anti-QS ou QSI a consisté en un screening des molécules commerciales et synthétiques citées ci-dessus sur le biosenseur de référence d'inhibition du QS *C. violaceum*

ATCC 12472, mais aussi sur la souche marine TC14. Les deux bactéries possèdent le phénotype commun de la production du pigment pourpre qui est la violacéine.

Les cultures ont été effectuées dans des erlenmeyers (100 mL) en présence des molécules tests. Ainsi, 20 mL de culture bactérienne en VNSS pour TC14 et en LB pour 12472 ont été réalisés. Les molécules ont été incorporées aux cultures à concentrations variant de 10 à 500 μ M en fonction de chaque molécule testée. Elles ont été au préalable dissoutes dans les milieux de culture correspondant à chaque souche. Pour chaque essai, une culture contrôle sans molécule a été réalisée. Les cultures ont été incubées à 20°C sous 120 rpm d'agitation pour TC14 et à 30°C sous 200 rpm d'agitation pour *C. violaceum*12472. Toutes les 24h, la croissance a été mesurée à 700 nm et la violacéine a été extraite puis mesurée à 575 nm. Chaque essai a été répété trois fois indépendamment.

2.8.3 Stries croisées 'T-stries' avec TC14 et d'autres bactéries marines

D'autres bactéries marines toutes aussi isolées de la rade de Toulon ainsi que celles qui font l'objet de cette étude ont été mises en culture avec TC14 en 'strie T-' sur des boîtes de Pétri contenant la gélose VNSS, comme déjà montré dans la Figure 21. Il s'agit des bactéries *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp.TC5 et *Shewanella* sp. TC9. Toutes les bactéries ont été cultivées en milieu VNSS jusqu'à atteindre le début de la phase stationnaire. Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C pendant 24 à 48h.

L'objectif de cette expérimentation a été de vérifier si les bactéries marines produisent des molécules du QS ou toutes autres molécules pouvant inhiber ou induire la production de violacéine de TC14 en milieux gélosés comme dans le cas avec certains biosenseurs.

3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées dans cette étude ont été effectuées à partir du logiciel GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). L'analyse des données (différents bio-essais) s'est faite en utilisant les tests ANOVA à un ou deux facteurs (ANOVA one ou two-way). Les effets de traitements ont été séparés avec les post tests à comparaison multiple Bonferroni ou Tukey. Les différences significatives ont été acceptées à partir de $p < 0,05$.

*Chapitre III :
Identification des AHLs
produites par les bactéries
marines*

1. Introduction

La plupart des bactéries utilisent le système QS pour exprimer certains gènes, notamment les gènes qui codent pour la formation de biofilm, la production de facteurs de virulence, la motilité. La littérature décrit des cas où la formation de biofilms bactériens est régulée par le QS. C'est le cas de *V. fischeri* (Hammer & Bassler, 2003), *Streptococcus* sp. (Cvitkovitch *et al.*, 2003), *P. aeruginosa* (Davies *et al.*, 1998), *Burkholderia cepacia* (Huber *et al.*, 2001)... Plusieurs auteurs ont fait état de la production d'AHLs chez des bactéries isolées de différents milieux aquatiques et marins (Cuadrado-Silva *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2009 ; Romero *et al.*, 2010). Cependant, peu d'études ont porté sur la caractérisation du système QS chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée, particulièrement la mise en évidence de la production d'AHLs chez des bactéries isolées de biofilms.

Le présent chapitre porte sur la mise en évidence d'un système QS fonctionnel chez quelques bactéries marines de notre laboratoire. Ces souches bactériennes ont été isolées de biofilms naturels dans la Méditerranée, plus précisément dans la rade de Toulon et ont déjà fait l'objet d'une thèse et d'une publication (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Ces travaux avaient permis de caractériser et d'identifier un certain nombre de ces souches (y compris une nouvelle espèce) et ont mis en évidence différentes propriétés de ces souches, notamment celles liées à la formation du biofilm *in vitro*. Les souches TC8, TC14 et TC15 appartenant toutes au genre *Pseudoalteromonas* avaient par exemple montré une bonne capacité à former un biofilm *in vitro*. En plus d'elles, une quatrième souche isolée du golfe de Morbihan, *Paracoccus* sp. 4M6, qui produit elle aussi un biofilm (Grasland *et al.*, 2003) a été utilisée afin d'obtenir une diversité dans la provenance, mais aussi dans le genre des souches étudiées.

Dans cette partie de la thèse, sachant que la formation de biofilm peut être sous le contrôle du QS chez certaines bactéries, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à mettre en évidence le QS des bactéries marines productrices de biofilm TC8, TC14, TC15 et 4M6, toutes Gram négatif, par l'identification des molécules AHLs. Dans un second temps, l'effet de certaines AHLs commerciales a été testé sur l'adhésion, la formation de biofilm et la motilité par swimming, swarming et twitching des bactéries marines soumises à cette étude.

2 Détection des AHLs des bactéries marines par les biosenseurs

2.1 Suivi de croissance des bactéries marines de cette étude

Afin de déterminer le temps nécessaire à chaque bactérie marine pour atteindre le début de la phase stationnaire, un suivi de la croissance des bactéries marines a été effectué pendant 24h en VNSS, un milieu de culture souvent utilisé pour la croissance des bactéries marines (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Camps *et al.*, 2011 ; Holmström *et al.*, 2002 ; Mardén *et al.*, 1985b). Il a porté sur les souches isolées de la rade de Toulon TC8, TC14 et TC15. Le suivi de croissance a permis de déterminer le temps nécessaire à chaque souche pour atteindre la phase stationnaire de croissance. Elle a également fourni des informations sur la durée de la phase stationnaire pour chaque bactérie (Figure 31).

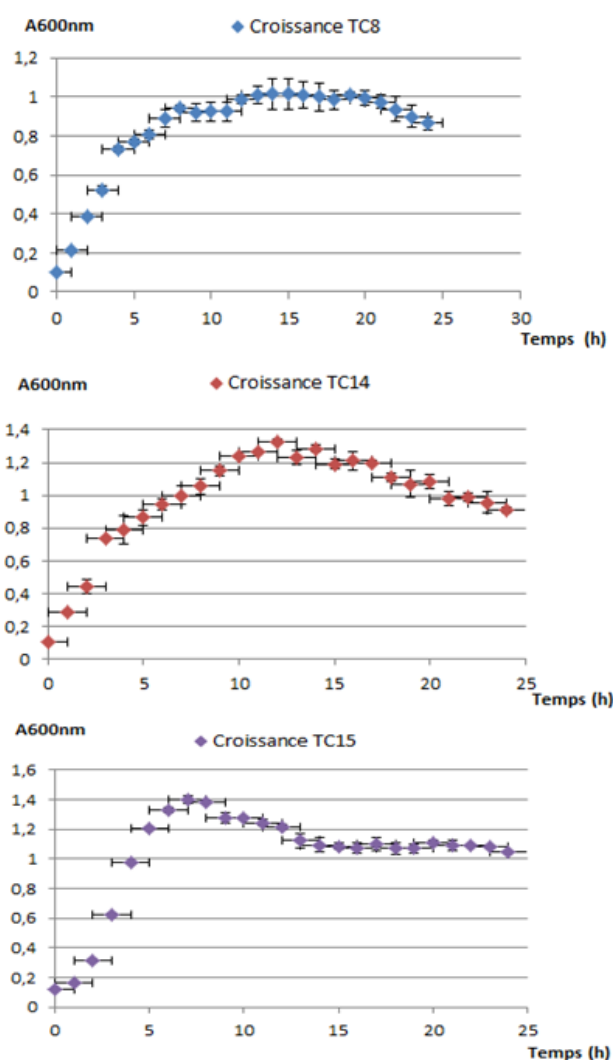


Figure 31 Courbes de croissance des bactéries marines TC. Cinquante millilitres de culture en VNSS incubées à 20°C pendant 24h. Les expériences ont été réalisées trois fois à partir de trois cultures différentes.

Les trois courbes de croissance présentent le même aspect et sont constituées de trois phases plus ou moins longues en fonction des bactéries. La phase exponentielle de croissance dure 7h pour TC8 et TC15 et 11h pour TC14. Pour chacune d'elles, la phase stationnaire est différente (quasi inexistante pour TC14), avec une phase de déclin ou de lyse cellulaire plus ou moins précoce. Ces informations seront intéressantes dans la mesure où elles permettront de déterminer la période à laquelle le QS peut être induit pour chaque souche, c'est-à-dire le moment où la population bactérienne atteint sa densité maximale. Selon plusieurs auteurs, la concentration des AHLs atteint un seuil critique en fin de phase exponentielle, donc en début de phase stationnaire (Cha *et al.*, 1998 ; Fuqua *et al.*, 1994 ; Rumbaugh *et al.*, 2011a). En effet, les AHLs sont des molécules qui sont produites en début de croissance et dont la concentration augmente avec la densité cellulaire durant la phase exponentielle de croissance, jusqu'à atteindre un seuil maximal en début de phase stationnaire (Fuqua *et al.*, 1994). A partir de ces informations, trois temps de culture ont été retenus afin d'y effectuer les extractions des AHLs des bactéries marines. Il s'agit de 6, 12 et 24h, qui correspondent aux différentes phases de la croissance de ces bactéries. Nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur les temps précoces de 6h et 12h, puisque dans nos conditions, 24h correspondent à un temps plus ou moins tardif où le déclin de la croissance bactérienne est presque déjà observable.

2.2 Suivi du pH au cours de la croissance des bactéries marines

Parallèlement au suivi de la croissance, la variation du pH des cultures bactériennes en fonction du temps de croissance a été mesurée régulièrement. Les variations du pH peuvent en effet avoir des conséquences sur la stabilité des AHLs. Certains auteurs ont montré qu'en milieu alcalin ($\text{pH} \geq 8,2$), l'ouverture du groupement lactone des AHLs était favorisée. Ceci rend difficile la détection par les techniques chromatographiques, mais aussi diminue la sensibilité des biosenseurs (Decho *et al.*, 2009; Tait *et al.*, 2009 ; Yates *et al.*, 2002). Toutefois, en acidifiant le milieu à pH 2, le cycle lactone peut être reconstitué (Tait *et al.*, 2009).

Le pH des cultures en VNSS de TC8 et TC15 a été suivi pendant 12h et celui de TC14 pendant 24h (Figure 32). Le choix du temps de suivi a été fait sur la base de la durée nécessaire à chaque souche pour atteindre le début de la phase stationnaire. Pour TC8 et TC15, les résultats montrent une variation du pH qui diminue de façon non significative au cours des quatre et cinq premières heures de croissance, avant de remonter jusqu'à atteindre

un pH de 7,2 à 12h ; pH qui correspond au pH initial (à t_0) et qui est sensiblement égal au pH du VNSS après autoclavage. Toutefois, après 12h d'incubation, le pH des cultures reste largement inférieur à 8,2 ce qui signifie que jusqu'à 12h de culture, il n'y aurait pas de risque de dégradation du cycle lactone, due à une élévation du pH. Pour la culture de TC14, le pH initial est plus bas (6,8). Il diminue également de façon non significative dans les 6 premières heures avant de remonter jusqu'à atteindre 7,6 au bout de 24h.

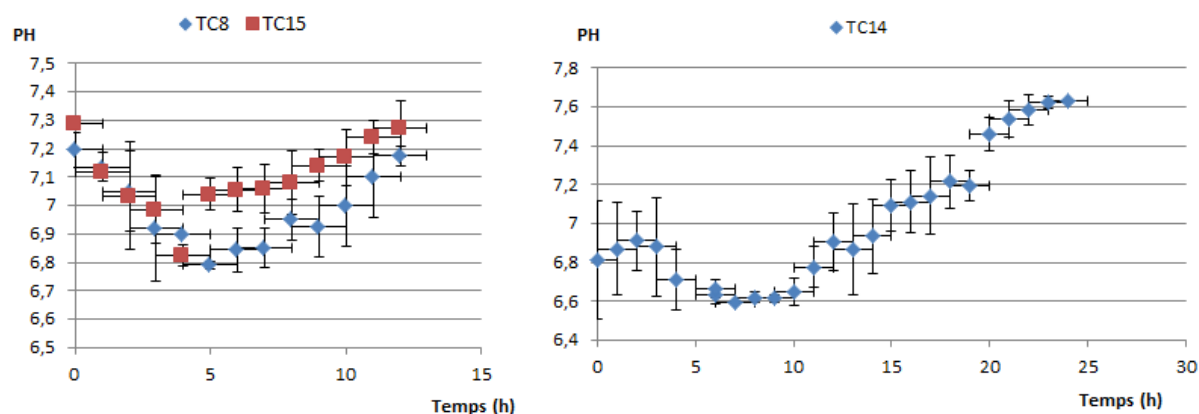


Figure 32 Suivi du pH des cultures bactériennes.

2.3 Choix du milieu de culture des différents types de bactéries

Le choix d'un milieu de culture commun aux bactéries marines et aux biosenseurs s'est avéré nécessaire pour la détection des AHLs des bactéries marines par les biosenseurs, puisque ces derniers semblent croître dans des conditions différentes. La croissance des bactéries marines et des biosenseurs a été testée sur trois milieux de cultures différents à savoir les milieux VNSS agar (VNSSA), Marine agar (MA) et LB agar (LBA), à 20°C. Les résultats sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 Croissance des différentes bactéries sur différents milieux de culture

Souches Géloses	TC8	TC14	TC15	4M6	CV026	31532	A136	KYC6
LBA	-	-	-	+	++	++	++	++
VNSSA	++	++	++	++	+/-	+/-	+/-	+/-
MA	++	++	++	+	-	-	-	-

+ : Croissance ; - : Pas de croissance ; +/- : Légère croissance

Le Tableau 21 montre que les biosenseurs ne croissent pas en MA et croissent difficilement en VNSSA. Les bactéries marines quant à elles croissent aussi bien en VNSSA qu'en MA, cependant, aucune croissance n'est observée en LBA. A partir de ces observations, il ressort que seul le milieu VNSS conviendrait à la croissance commune des bactéries marines et des biosenseurs sur une même boîte de Pétri, quand bien même les biosenseurs y croissent difficilement. Le milieu VNSS a donc été retenu pour réaliser les stries croisées (stries T-) entre les biosenseurs et les bactéries marines, en vue de détecter les AHLs produites par les bactéries marines. Par ailleurs, la température de 20°C a été retenue pour la réalisation des stries T-, étant donné que les bactéries marines ne se développent pas du tout à 30°C, la température optimale de croissance des biosenseurs.

2.4 Détection des AHLs avec les biosenseurs

La première méthode de détection des AHLs des bactéries marines a été l'utilisation des biosenseurs. Cette méthode reste l'une des plus sensibles car elle permet la détection de faibles concentrations d'AHLs (de l'ordre du nano gramme) (Steindler & Venturi, 2007). Deux biosenseurs ont permis de réaliser cette étude. Ils possèdent chacun des gènes rapporteurs qui leur permettent de détecter les molécules du QS, en l'occurrence les AHLs exogènes et de les mettre en évidence sous forme de changement phénotypique (coloration). Il s'agit du biosenseur *C. violaceum* CV026 accompagné de son contrôle positif, la souche ATCC3 31532 (McClellan *et al.*, 1997) et du biosenseur *A. tumefaciens* A136 avec son contrôle positif, la souche KYC6 (Fuqua & Winans, 1994 ; Zhu *et al.*, 1998). CV026 possède le gène récepteur *cviR* qui répond avec fidélité à la C₆-HSL produite par 31532, ainsi qu'à d'autres AHLs à courte chaîne latérale (McClellan *et al.*, 1997). A136 quant à lui contient le gène récepteur *traR* associé au gène rapporteur *lacZ* qui répond parfaitement à la 3-oxo-C₈-HSL produite par la KYC6 et à bien d'autres AHLs à longue chaîne latérale (Steindler & Venturi, 2007).

Quatre bactéries marines (TC8, TC14, TC15 et 4M6) ont ainsi été testées pour leur capacité à produire des AHLs, à partir de quatre approches différentes utilisant les biosenseurs.

2.4.1 Stries croisées (stries T-) entre les bactéries marines et les biosenseurs

La méthode de détection des AHLs par stries croisées ou stries T- consiste à strier sur une même gélose à proximité l'une de l'autre, le biosenseur et la bactérie marine dont on teste

la production d'AHLs. La proximité favorise la diffusion des AHLs de la bactérie marine vers le biosenseur et induit ainsi le QS de ce dernier.

Les résultats des stries croisées entre les bactéries marines TC8, TC14, TC15, 4M6 et les biosenseurs CV026 et A136 sont présentés par la Figure 33.

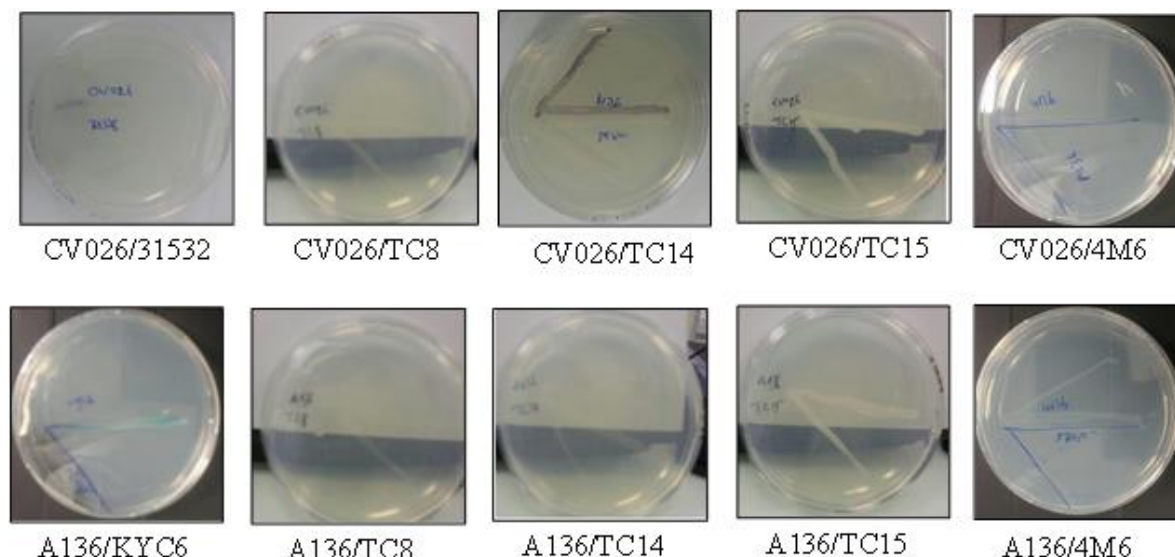


Figure 33 Détection des AHLs chez les bactéries marines par la technique en 'strie T-'.

Il ressort qu'aucune coloration (violette et bleue), correspondant respectivement à la production de violacéine chez CV026 et à la production de β galactosidase, clivant le substrat chromogène X-gal préalablement ajouté dans le milieu chez A136, n'est observée chez les bactéries marines. Ceci suggère que dans ces conditions, aucune des bactéries marines n'a produit un signal associé au QS qui est reconnu par les biosenseurs. En revanche, chaque biosenseur a répondu à son contrôle positif. En effet, une légère coloration violette est observée chez CV026 quand il est strié avec son contrôle positif 31532 (1^{er} quadrant en haut, à gauche). Ceci est dû au fait que 31532 produit la C₆-HSL qui diffuse à travers la gélose, se lie au récepteur CviR homologue de LuxR chez *C. violaceum* et forme le complexe C₆-HSL/CviR qui se fixe au promoteur des gènes *vioABCD* et induit la transcription de ceux-ci. Ce qui se traduit par l'apparition de la coloration pourpre, caractéristique de la violacéine (McClean *et al.*, 1997 ; Morohoshi *et al.*, 2010). Par la même occasion, lorsqu'A136 est strié avec KYC6, on observe une faible coloration bleue, qui est due à la production de la 3-oxo-C₈-HSL par la KYC6, qui se fixe au récepteur TraR homologue de LuxR chez A136. Le complexe 3-oxo-C₈-HSL/TraR se fixe à son tour au promoteur du gène *lacZ*, induisant la

production de la β -galactosidase qui dégrade le X-gal disponible dans le milieu ; ce qui se visualise par la coloration bleue des colonies (Zhu *et al.*, 2003).

La faible intensité de la coloration observée chez les deux biosenseurs en présence de leurs contrôles positifs respectifs pourrait être liée à leur difficulté à croître correctement en milieu VNSS. En effet, certains auteurs avaient déjà rapporté la difficulté à faire croître des bactéries d'origine marine et des biosenseurs non marins sur une même gélose. Nous citons entre autres, Huang et collaborateurs en 2007, qui ont dû inventer une technique permettant de faire pousser séparément chaque type de bactéries sur son milieu de culture convenable. Citons également García-Aljaro *et al.* (2012) qui ont rajouté 1,5% de NaCl au milieu TSB, dans le but de rapprocher au mieux la concentration saline de ce dernier à celle des milieux marins, afin d'y favoriser la croissance des souches marines.

Le fait que les bactéries marines n'aient pas pu induire le QS des biosenseurs dans ces conditions ne signifie pas qu'elles ne produisent pas d'AHLs. Tout d'abord, parmi la gamme très variée d'AHLs existantes, CV026 et A136 ne reconnaissent qu'une gamme étroite. En effet, CV026 est le biosenseur des courtes et moyennes chaînes d'AHLs. Il reconnaît la C₆-HSL son ligand naturel, mais aussi la 3-oxo-C₆-HSL, la C₈-HSL et la C₄-HSL avec lesquelles il est 11 à 30 fois moins sensible (Steindler & Venturi, 2007). Il ne reconnaît cependant aucun dérivé 3-hydroxy-HSL. A136 quant à lui est considéré comme le biosenseur possédant une large gamme de détection d'AHLs, avec une meilleure affinité pour les longues chaînes. Il est très sensible à la 3-oxo-C₈-HSL, mais possède en plus une sensibilité, quoique moindre, pour la gamme de C₆-HSL à C₁₂-HSL, 3-oxo-C₄-HSL à 3-oxo-C₁₂-HSL, ainsi que certains dérivés 3-hydroxy-HSL tels que les 3-OH-C₆-HSL à 3-OH-C₁₀-HSL (Steindler & Venturi, 2007 ; Zhu *et al.*, 2003). Il faut noter d'autre part que les biosenseurs affichent une croissance limitée en milieu VNSS ; ce qui pourrait fortement diminuer leur capacité de détection des AHLs.

A ce stade de l'étude, il a été difficile de conclure quant à la production d'AHLs par les bactéries marines, que ce soit les AHLs dans la gamme reconnue par les biosenseurs, ou toutes les AHLs en générale. En effet, soit les bactéries marines produisent de faibles quantités d'AHLs qui sont difficilement reconnues par les biosenseurs dans ces conditions, soit elles produisent d'autres AHLs qui ne sont pas détectées par les deux biosenseurs, ou encore, elles ne produisent pas d'AHLs. Pour répondre à ces interrogations, d'autres techniques de détections ont été essayées, dont celle décrite par Huang *et al.* en 2007.

2.4.2 Culture séparée des biosenseurs et bactéries marines

Cette technique de détection des AHLs par les biosenseurs a été décrite pour la première fois par Huang *et al.* en 2007 au cours d'une étude sur la détection des AHLs dans les biofilms subtidals (Huang *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2009). C'est une technique qui peut permettre de résoudre le souci de milieu de culture entre les bactéries marines et les biosenseurs. Elle consiste à faire pousser chaque type de bactéries sur son milieu convenable, avec sa température optimale de croissance avant de les mettre en interaction.

Ainsi, les biosenseurs ont été cultivés séparément sur gélose LB et incubés à 30°C, tandis que les bactéries marines ont été cultivées sur gélose VNSS à 20°C. Après que les bactéries aient correctement poussé, les deux géloses (VNSSA et LBA) ont été mises l'une en contact de l'autre, de sorte à permettre la diffusion d'éventuelles AHLs de la bactérie marine vers le biosenseur. Les résultats sont présentés par la Figure 34.

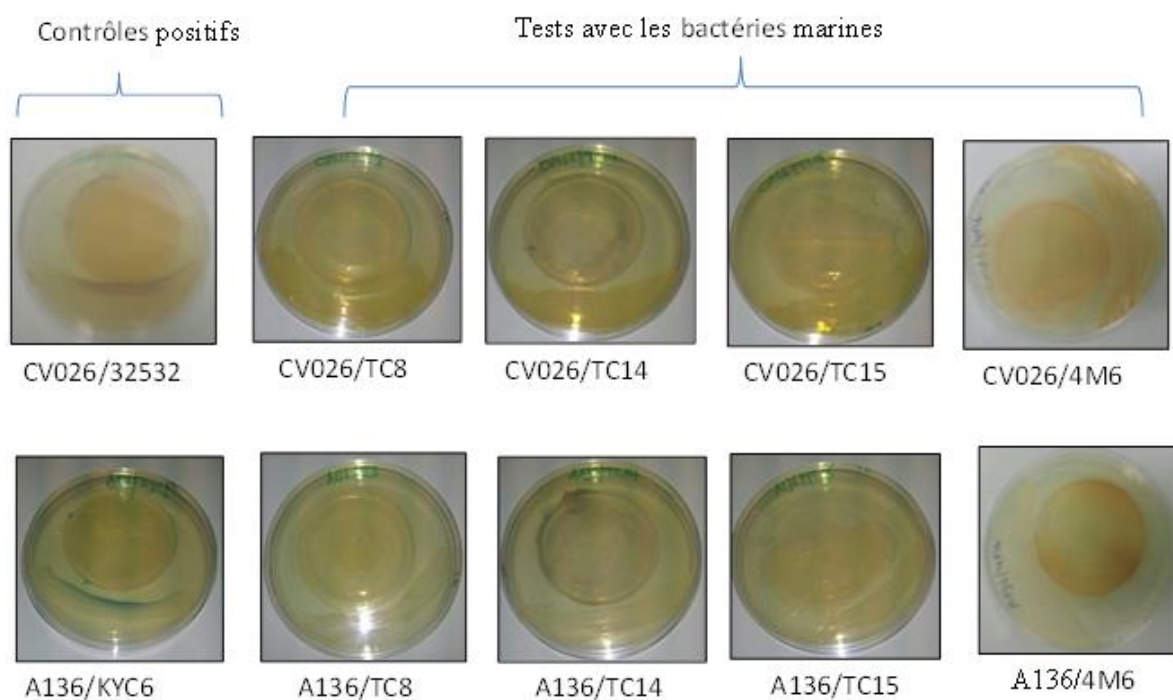


Figure 34 Détection des AHLs des bactéries marines par la technique des géloses séparées.

Tout comme dans la technique de détection par stries croisées, les biosenseurs n'ont que peu répondu (faiblement) à leurs contrôles positifs respectifs, bien qu'ils aient normalement poussés. Néanmoins, aucune réponse des biosenseurs n'a été observée pour les quatre bactéries marines testées. Au vu de ces résultats, deux hypothèses peuvent être émises.

Soit les bactéries marines ne produisent pas d'AHLs dans la gamme reconnue par les biosenseurs, soit cette technique n'a pas permis un rapprochement suffisant des bactéries marines et des biosenseurs, afin de favoriser une bonne diffusion d'éventuels signaux des bactéries marines vers les biosenseurs. Cette dernière hypothèse peut être confirmée par la faible coloration observée chez les biosenseurs en présence même de leurs contrôles positifs. Encore une fois, ces résultats ne permettent pas de conclure définitivement quant à la capacité des bactéries marines à produire les AHLs suivantes : de C₄ à C₁₂-HSLs pour ce qui est des AHLs à chaîne latérale non substituées et de 3-oxo-C₄ à 3-oxo-C₁₂-HSL pour les dérivés oxo substitués d'AHLs.

2.4.3 Recouvrement après CCM

Afin de confirmer ou d'infirmer les deux premiers résultats, des techniques impliquant cette fois-ci l'utilisation d'extraits de bactéries marines plutôt que les bactéries vivantes ont été utilisées. L'une d'elles est la chromatographie sur couche mince des extraits, suivi du recouvrement de la plaque chromatographique par une culture en phase exponentielle de croissance des biosenseurs A136 et CV026 qui sont considérés comme des révélateurs colorimétriques. Ainsi, des solutions d'AHLs commerciales ainsi que des extraits organiques des biosenseurs contrôles (31532 et KYC6) et les extraits de 6h et 12h des bactéries marines ont été semi-purifiés par CCM (Figure 35). La CCM permet de séparer les différentes molécules présentes dans les extraits, sous forme de spots individualisés. Cette semi-purification des molécules facilite leur détection par les biosenseurs dont les cultures recouvrent la plaque chromatographique.

Sur la plaque révélée par CV026, celui-ci reconnaît la C₆-HSL commerciale et une molécule présente dans l'extrait de 31532 qui pourrait être la C₆-HSL naturelle produite par 31532 (spots violets). En effet, les deux molécules ont à peu près le même rapport frontal. CV026 ne reconnaît cependant pas de molécules dans les extraits de toutes les bactéries marines. Il en est de même pour A136 qui répond très bien à la 3-oxo-C₈-HSL commerciale (1^{er} spot bleu à partir de la gauche), et plus faiblement au standard 3-oxo-C₆-HSL (2^{ème} spot bleu à partir de la gauche), ainsi qu'à trois molécules distinctes de l'extrait de son contrôle positif KYC6. Parmi ces trois molécules, une semble correspondre à la 3-oxo-C₈-HSL pour avoir la même distance de migration (1^{er} spot à partir du haut). Tout comme chez CV026, les molécules présentes dans les extraits des bactéries marines ne déclenchent pas de réponse chez A136 (Figure 36).

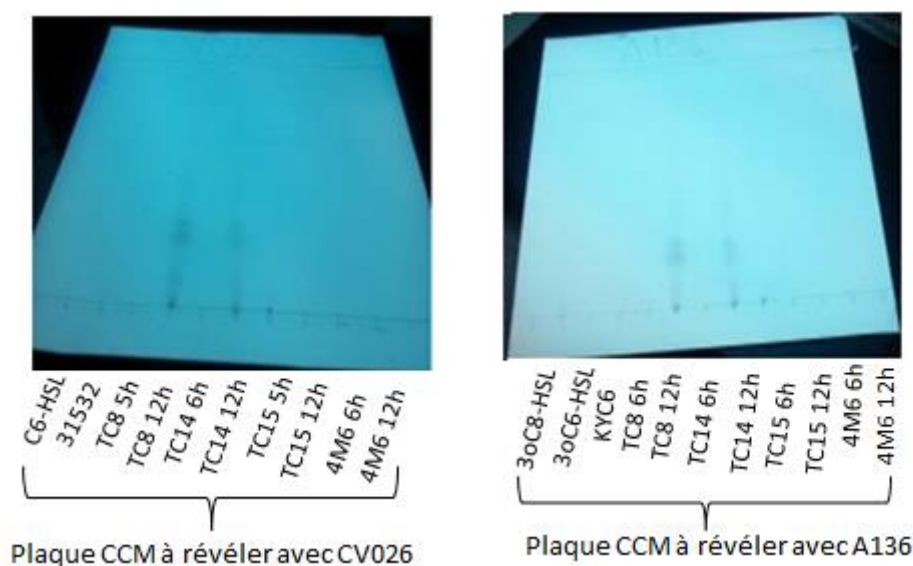


Figure 35 Plaques chromatographiques après CCM.

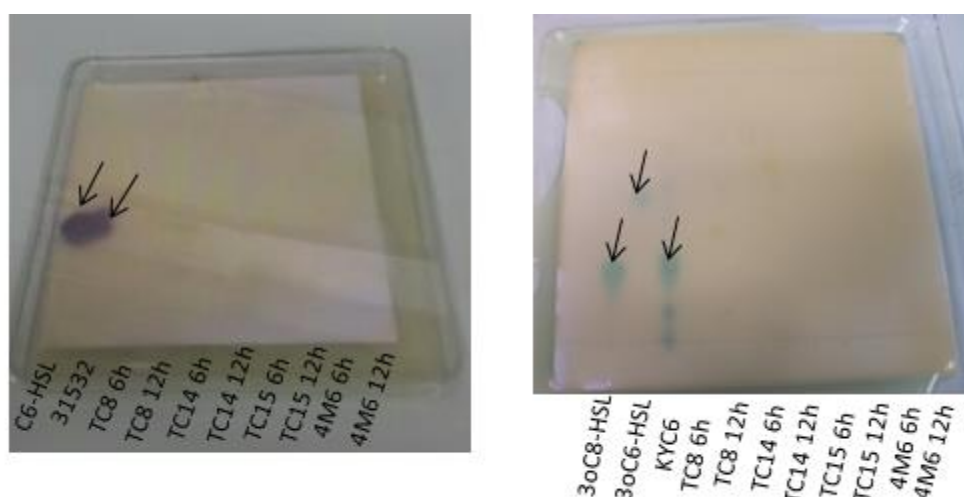


Figure 36 Révélation des plaques CCM par les biosenseurs.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux des deux premières techniques de détection déjà utilisées. La méthode de révélation après CCM a été décrite pour la première fois par Shaw *et al.* en 1997. C'est une méthode qui est censée augmenter la sensibilité des biosenseurs, dans la mesure où les molécules sont préalablement semi-purifiées par séparation chromatographique. Plusieurs AHLs ont été détectées chez diverses bactéries à partir de cette méthode (Cha *et al.*, 1998 ; García-Aljaro *et al.*, 2012 ; Khan *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 1997). Toutefois, cette méthode dite «sensible» semble avoir mené aux mêmes résultats que précédemment. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les bactéries marines d'intérêts ne produisent pas d'AHLs dans la gamme reconnue par les biosenseurs.

2.4.4 Méthode avec les extraits totaux de bactéries

Une autre approche basée sur l'utilisation des extraits totaux (non purifiés) de bactéries, moins décrite dans la littérature a été testée afin de confirmer que les bactéries marines ne produisent pas de molécule AHL. Elle a consisté à déposer un aliquot d'extraits organiques de bactéries sur une gélose LB et à strier autour de l'extrait, le biosenseur.

Les résultats sont présentés par la Figure 37.

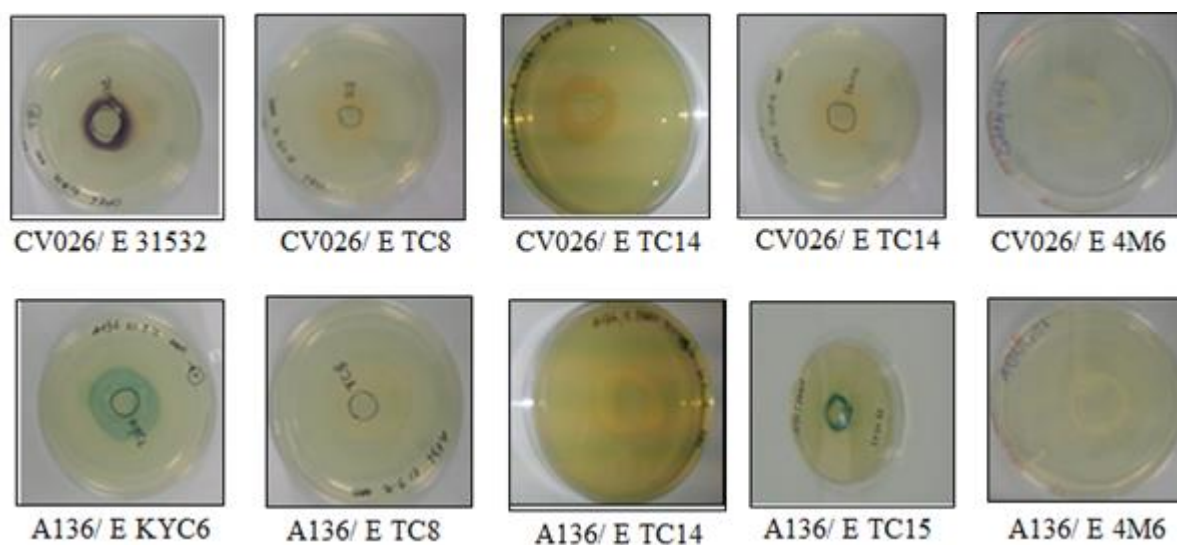


Figure 37 Détection des AHLs à partir des extraits totaux de bactéries marines.

E= Extrait

La mise en contact directe des biosenseurs avec les extraits bruts totaux de bactéries marines a permis de déclencher une réponse positive chez le biosenseur A136 pour l'extrait de TC15, puisqu'une coloration bleue a pu être observée (2^{ème} cadre partant de la droite en bas). En plus, cette fois-ci une forte intensité est observée dans la réponse des biosenseurs en présence des extraits de leurs contrôles positifs ; ce qui n'a pas été le cas dans les trois premières méthodes de détection. Ce résultat va dans le même sens que les observations de Rumbaugh collaborateurs en 2011 selon lesquelles, l'extrait chimique des AHLs peut augmenter la sensibilité des biosenseurs en plus de fournir du matériel conséquent pour les analyses complémentaires, telles que les analyses chromatographiques et spectrales (Rumbaugh *et al.*, 2011a).

Cette méthode, quoique peu utilisée peut réunir plusieurs conditions qui pourraient faciliter la détection des AHLs par les biosenseurs. La première condition est que les biosenseurs croissent bien sur leur milieu optimal qui est le LB. La deuxième raison est que

même s'il n'est pas purifié, l'extrait total fournit suffisamment de matériel capable de déclencher une réponse chez les biosenseurs. De plus, dans cette méthode, 10 µL d'extrait total ont été appliqués sur la gélose contrairement à la méthode basée sur la CCM où seulement 2 µL d'extrait ont été appliqués sur la plaque chromatographique. L'augmentation du volume d'extrait pourrait bien améliorer la détection des molécules par les biosenseurs.

De ces résultats, il a été déduit que l'extrait de TC15 pourrait contenir les AHLs 3-oxo-C₆ à 3-oxo-C₁₂-HSLs et C₁₀ à C₁₂-HSLs qui sont reconnues par A136. La 3-oxo-C₈-HSL n'a pas été ciblée parce que c'est une AHL qui est toujours détectée, même à faible quantité par A136. Sa présence chez TC15 aurait induit une réponse chez A136 dès les premières expériences. Les AHLs à chaînes latérales supérieures ou égales à quatorze atomes de carbones, contenant ou non une substitution oxo ainsi que la plupart des dérivés hydroxy-AHL ont été également éliminées de la liste d'AHLs ciblées parce que n'étant pas ordinairement reconnues par A136.

Le fait que les bactéries marines TC8, TC14 et 4M6 n'ont pas réussi à induire le QS des biosenseurs ne signifie pas qu'elles ne produisent pas d'AHLs. Comme cela a été mentionné plus haut, les biosenseurs utilisés dans cette étude ne détectent pas toutes les AHLs qui existent dans la nature.

3 Détection des AHLs par LC-ESI-MS

L'étape suivante a été de rechercher des AHLs dans les extraits de bactéries par des analyses chromatographiques et spectrales. Cette approche permet en plus d'obtenir des informations sur la structure de la ou des AHLs détectées. Ainsi, les analyses spectrales pourraient permettre de déterminer la structure de la ou des AHLs produites par TC15, mais aussi et surtout de mettre en évidence d'éventuelles AHLs présentes dans les extraits des autres bactéries marines, chez qui aucune AHL n'a été détectée par les biosenseurs. Deux méthodes d'analyses spectrales sont couramment décrites dans la littérature pour détecter et identifier les AHLs. Il s'agit de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Morin *et al.*, 2003; Ortori *et al.*, 2007) et de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Cataldi *et al.*, 2004 ; Cataldi *et al.*, 2007). La LC-ESI-MS est la méthode de détection des AHLs la plus utilisée après celle des biosenseurs. Elle permet d'identifier mais aussi de quantifier différents types d'AHLs dans les extraits bactériens. Son principe consiste à séparer les molécules d'un échantillon et à en identifier la

structure, grâce à la détermination de la masse molaire par le spectromètre de masse. C'est une méthode cependant pas très sensible parce que nécessitant de grandes quantités de matériel (de l'ordre de dizaines de microgrammes voir du milligramme) (Cataldi *et al.*, 2004). La plupart des études qui ont porté sur la détection des AHLs ont commencé par l'analyse des AHLs commerciales dites AHLs standards. Nous ne sommes donc pas restés en marge de ce schéma.

3.1 Analyses LC-ESI-MS des AHLs standards

L'analyse des AHLs standards est une étape préliminaire dans la détection des AHLs dans les extraits bactériens en LC-MS. Elle permet d'une part de tester la colonne chromatographique dans le but de vérifier si elle convient à la séparation des dérivés lactones. D'autre part, elle permet d'obtenir des informations sur le temps de rétention de chaque AHL, mais aussi sur le type de fragmentation associée à chaque AHL. Ces différentes informations seront utiles pour l'identification ultérieure des AHLs dans les extraits bactériens. Elles serviront de contrôles positifs dans les essais avec les extraits bactériens.

La Figure 38 présente le chromatogramme LC-MS en mode +ESI d'un mélange de sept AHLs standards disponibles dans le laboratoire. Les différentes molécules sortent de la colonne chromatographique en fonction de leur masse croissante, de la C₄-HSL (171) à la C₁₄-HSL (311).

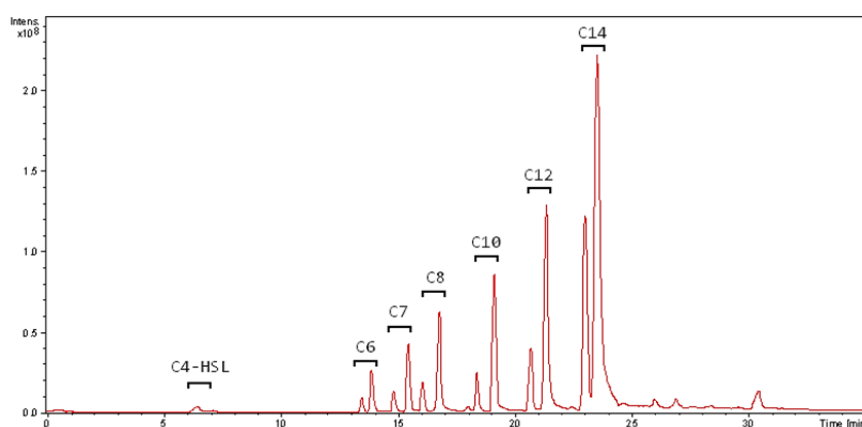


Figure 38 Chromatogramme HPLC en mode ESI d'un mélange de sept AHLs standards.

Après cette première séparation des AHLs commerciales, les conditions de séparation ont été optimisées et les standards AHLs ont été réinjectés de façon individuelle dans la colonne chromatographique. Les informations relatives à chaque standard AHL prenant en

compte le temps de rétention, l'ion précurseur, l'ion produit ainsi que les ions fragments obtenus ont été répertoriées dans le Tableau 22.

Tableau 22 Temps de rétention et ions produits pour chaque standard après la LC-MS.

AHLs standards	Temps de rétention (min)	Ions précurseurs [M+H] ⁺	Autres ions produits (m/z)	Autres fragments (m/z)
C₄-HSL	6,4	172,06	101,97	130,86, 193,85
C₆-HSL	12,5	199,96	102,03	221,96
C₇-HSL	13,7	214,06	102	236,02
C₈-HSL	15,1	228,03	102	249,95
C₁₀-HSL	17,5	256,08	102	277,99
C₁₂-HSL	19	284,06	101,95	108,87 ; 306,06
C₁₄-HSL	21,8	312,24		334
3-oxoC₆-HSL	10,5	213,96	101,99	113 ; 236
3-oxoC₈-HSL	13,4	241,99	102,02	140,94 ; 264
3-oxoC₁₂-HSL	17,9	298,02	102	196,87 ; 320,04

Les ions produits sont le résultat de la fragmentation d'une AHL dans le deuxième spectromètre de masse (SM2). Le principal ion produit est l'ion fragment m/z 102, caractéristique du cycle lactone. C'est le fragment commun à toutes les AHLs (Figure 39). Les autres ions fragments ont tendance à varier en fonction de la structure de chaque AHL. Les séries non substituées d'AHLs ont tendance à produire des ions $[M+H-18]^+$, $[M+H-28]^+$, $[M+H-102]^+$ et $[M+H-120]^+$, correspondant respectivement à une perte d'eau, de groupement CO, de groupement HSL et à une perte combinée d'eau et du groupement HSL (Morin *et al.*, 2003 ; Ortori *et al.*, 2007), alors que les dérivés 3-oxo-AHLs substituées auront tendance à produire que les ions $[M+H-18]^+$, correspondant à la perte d'une molécule d'eau et $[M+H-102]^+$, correspondant à la perte du cycle lactone (Morin *et al.*, 2003 ; Ortori *et al.*, 2007). Un autre ion fragment a été obtenu chez presque les standards AHLs dans cette étude. Il s'agit de l'ion fragment $[M+Na]^+$ ou (M+23) qui correspond à un gain d'atome de sodium. Cette analyse a également permis de déterminer le temps de rétention correspondant à chaque AHL standard. Celui-ci devra être comparé au temps de rétention des molécules pouvant être des AHLs dans les extraits bactériens. Le temps de rétention entre une AHL pure et une AHL contenue dans un extrait bactérien peut varier de quelques secondes mais ne doit pas être supérieure à une minute. Les AHLs standards dans cette étude ont été éluées entre 6 et 18 min.

Il faut noter que dans les chromatogrammes individuels des AHLs standards (non présentés ici), le pic principal ne correspond pas à la molécule analysée. Toutes les informations

obtenues ont permis d'amorcer l'étape analyse LC-ESI-MS des extraits organiques des quatre bactéries marines.

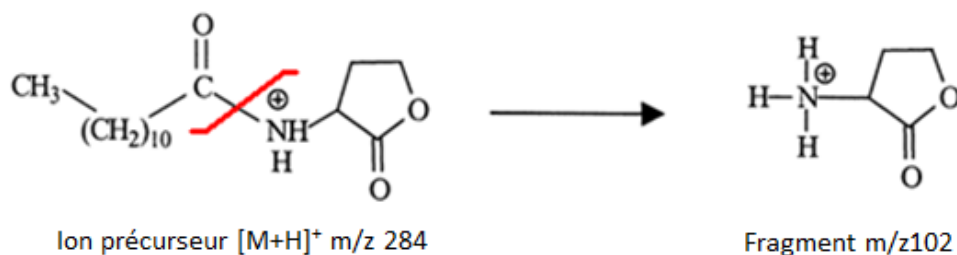


Figure 39 Fragmentation de l'AHL pour l'obtention du fragment m/z 102.
Exemple de la C_{12} -HSL

3.2 Analyses LC-MS des extraits de bactéries

Les extraits des bactéries marines en phase exponentielle de croissance (6h) et en début de phase stationnaire (12h) ont été analysés dans les mêmes conditions que les AHLs commerciales, avec le même volume d'extrait injecté dans la colonne chromatographique, soit 25 μ L. L'avantage d'utiliser des extraits de culture à différentes phases de croissance bactérienne est que cela pourrait permettre de déterminer à quelle étape de la croissance les molécules sont produites et le moment où le signal devient intense dans le milieu. Dans le cadre de cette étude, il ressort que pour chaque bactérie testée, les extraits de 6h et 12h et même ceux de 24h présentent le même profil chromatographiques. Cela signifierait qu'il n'y a pas une profonde variation dans les molécules produites par ces bactéries entre ces différentes phases de la croissance.

Les chromatogrammes LC-ESI-MS des extraits des bactéries marines TC8, TC14, TC15 et 4M6 sont présentés respectivement dans les Figures 40 à 43.

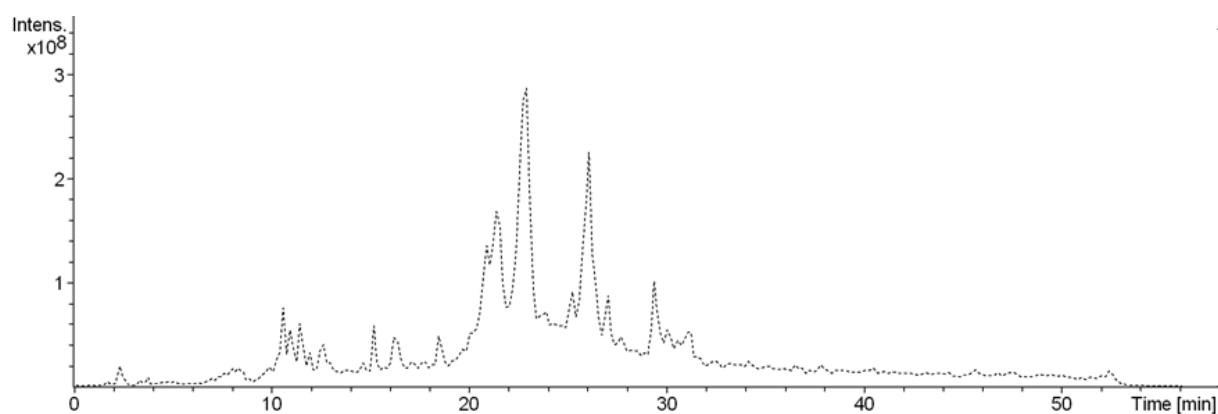


Figure 40 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de TC8.

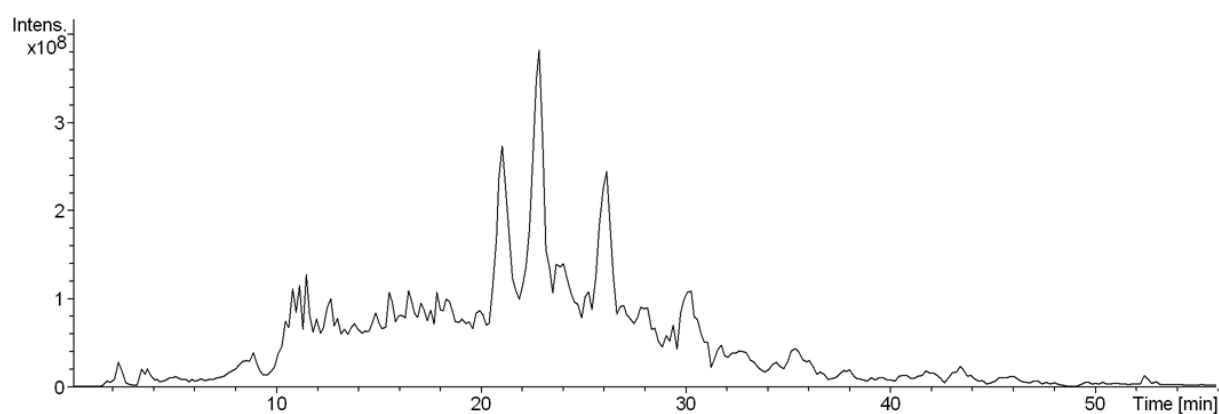


Figure 41 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de TC14.

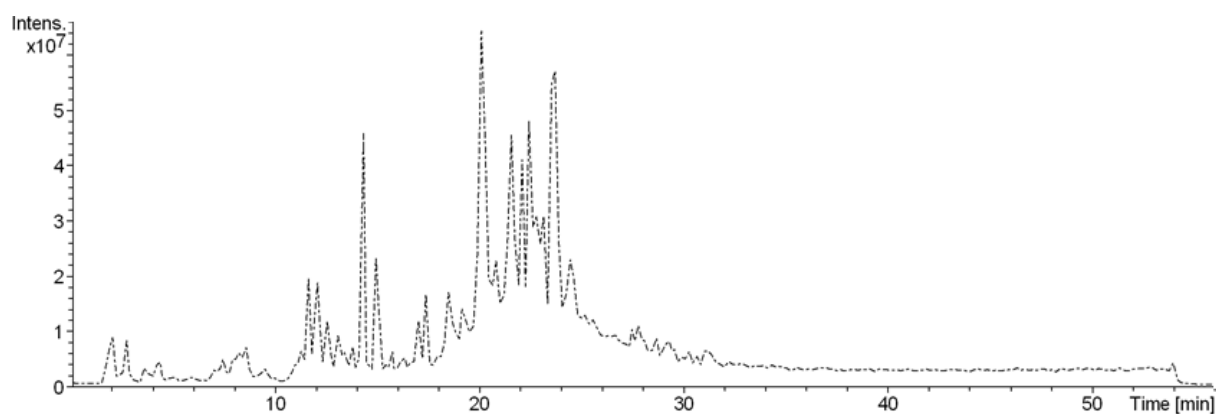


Figure 42 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de TC15.

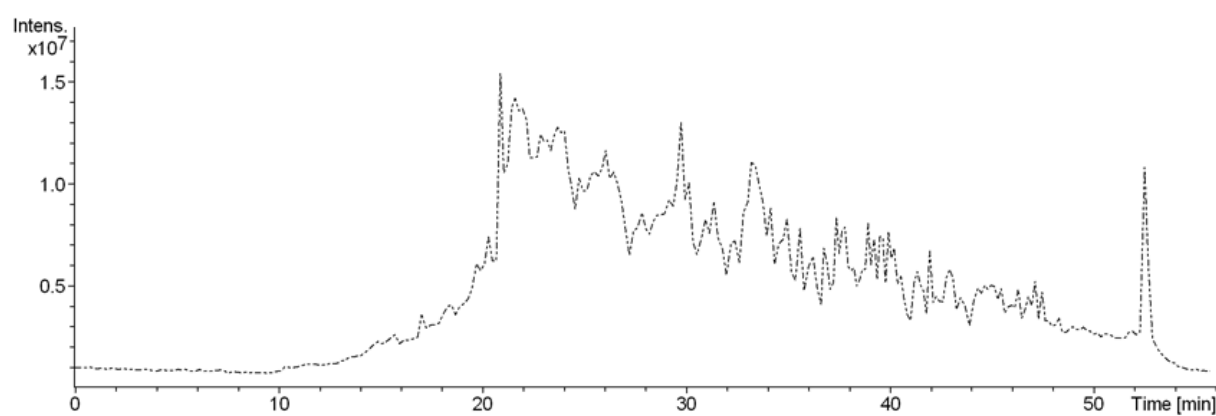


Figure 43 Chromatogramme LC-ESI-MS de l'extrait de 4M6.

Comme cela a été suggéré plus haut, l'identification des AHLs dans les extraits des bactéries marines s'est faite en comparant les informations données par le spectromètre de masse au sujet de chaque pic du chromatogramme aux informations déjà connues sur les AHLs standards. Quatre paramètres ont été pris en compte :

- (i) la recherche de l'ion précurseur $[M+H]^+$ correspondant à la masse donnée par le premier spectromètre de masse. Il s'agit du pic moléculaire.
- (ii) la comparaison du temps de rétention de la molécule inconnue à ceux des AHLs standards.
- (iii) la recherche de l'ion fragment m/z 102 caractéristique du groupement HSL, donné par le deuxième spectromètre de masse (SM2).
- (iv) la recherche des autres ions fragments produits en SM2.

En se basant sur les temps de rétention des AHLs standards, il a été estimé que les AHLs contenues dans les extraits des bactéries ne pourraient être éluées qu'entre 6 et 30 min. La marge de temps a été augmentée en tenant compte des chaînes d'AHLs longues de plus 14 carbones, telles que la C₁₆-HSL, la C₁₈-HSL et leurs dérivés oxo substitués qui n'ont pas été analysés dans cette étude. Par exemple, une molécule ayant la même masse $[M+H]$ que la C₁₀-HSL (256), qui a cependant un temps de rétention de 25 min au lieu de 17,5 min sera immédiatement éliminée même si elle possède l'ion caractéristique m/z 102. Par la même occasion, une molécule inconnue qui a la même masse et le même temps de rétention qu'une AHL à quelques secondes près sera éliminée si elle ne possède pas l'ion caractéristique m/z 102 et à un degré moindre les autres ions fragments.

En prenant en compte chacun des quatre paramètres d'identification, il a été constaté qu'aucun pic ne s'identifiait à une AHL dans les extraits des bactéries marines TC8, TC14 et 4M6. Cependant, une molécule a été identifiée comme pouvant être la C₁₂-HSL dans les extraits de TC15. En effet, cette molécule possède les mêmes caractéristiques que la C₁₂-HSL commerciale, à savoir la même masse $[M+H] = 284$, le même temps de rétention $t_R = 19$ min, l'ion caractéristique des lactones m/z 102 ainsi qu'une fragmentation presque similaire à quelques différences près (Figures 44, 45 et 46). En plus du standard C₁₂-HSL, la présumée C₁₂-HSL possède les mêmes caractéristiques que la C₁₂-HSL identifiée dans l'extrait de la bactérie *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII dans les travaux d'Ortori *et al.* en 2007. De toute évidence, elle pourrait être l'AHL qui a induit le QS chez le biosenseur A136 dans les expérimentations précédentes.

Le signal de cette AHL a été détecté dans tous les extraits de TC15 mais a été plus intense dans l'extrait de 12h. Cela confirme bien le fait que les AHLs sont des molécules beaucoup mieux détectables en début de phase stationnaire de croissance.

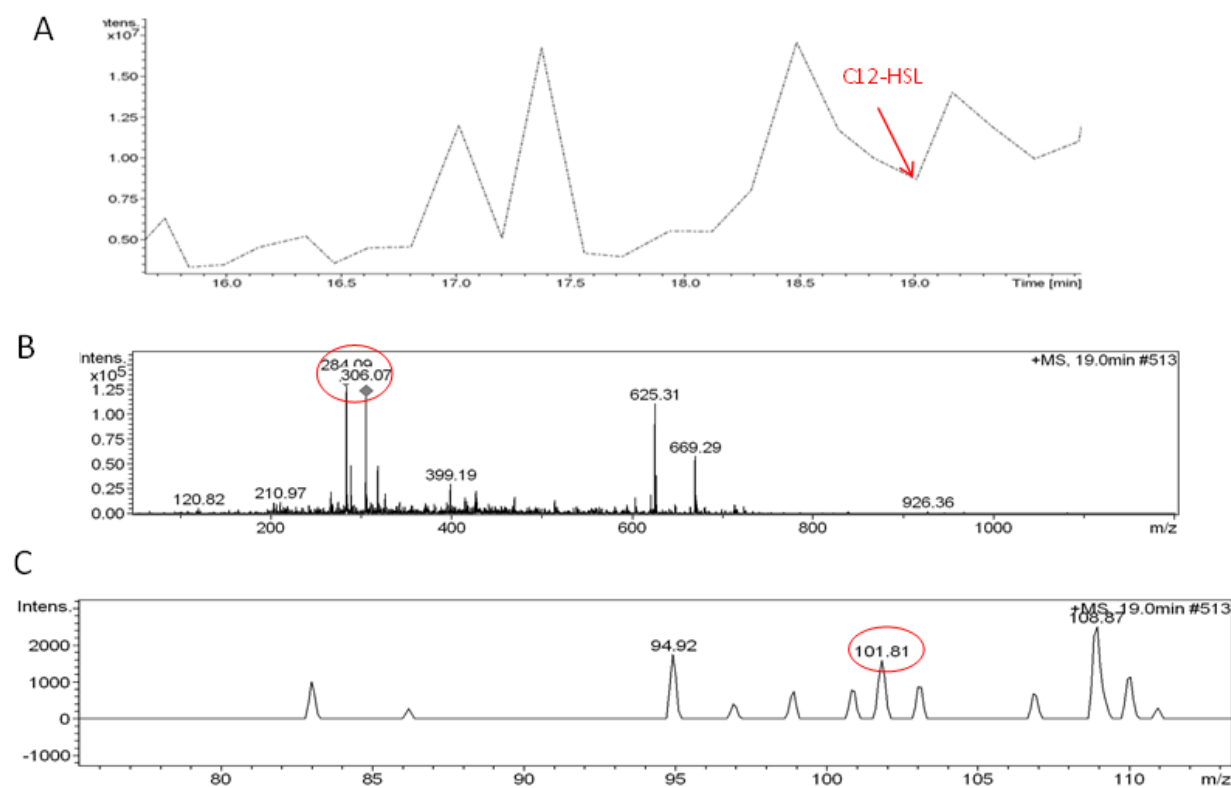


Figure 44 Spectre de masse de la molécule à $t_R = 19$ min.

- (A) Pic à $t_R = 19$ min, correspondant au temps de rétention de la C₁₂-HSL
- (B) Les deux ions précurseurs $[M+H]^+ = 284$ et $[M+Na]^+ = 306$ caractéristiques de la C₁₂-HSL
- (C) Ion caractéristique des homosérines lactones m/z 102

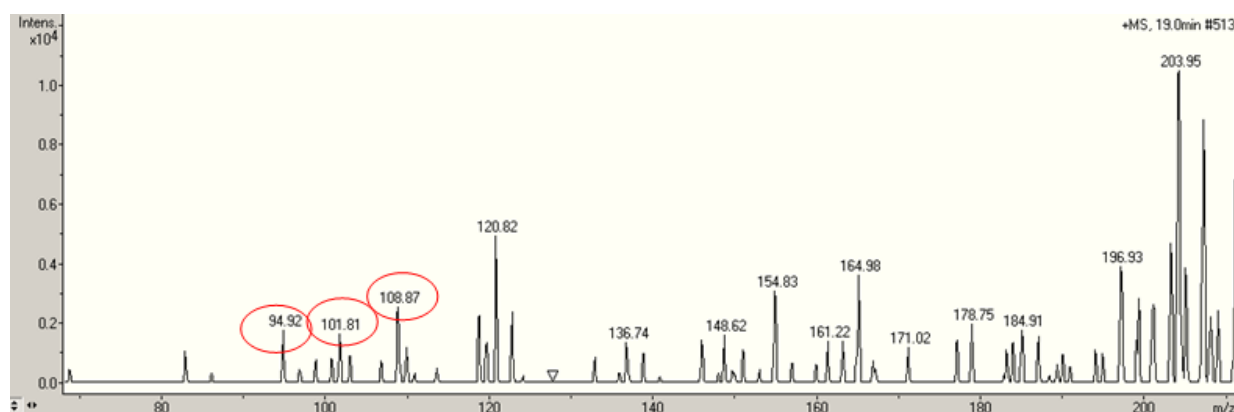


Figure 45 Spectre de masse de la molécule à $t_R = 19$ min.

Fragmentation en SM2 de la C₁₂-HSL dans l'extrait de TC15

Les ions m/z 95 et m/z 108,87 représentent des ions fragments caractéristiques de la C₁₂-HSL dans l'extrait de *Y. pseudotuberculosis* (Ortori *et al.*, 2007).

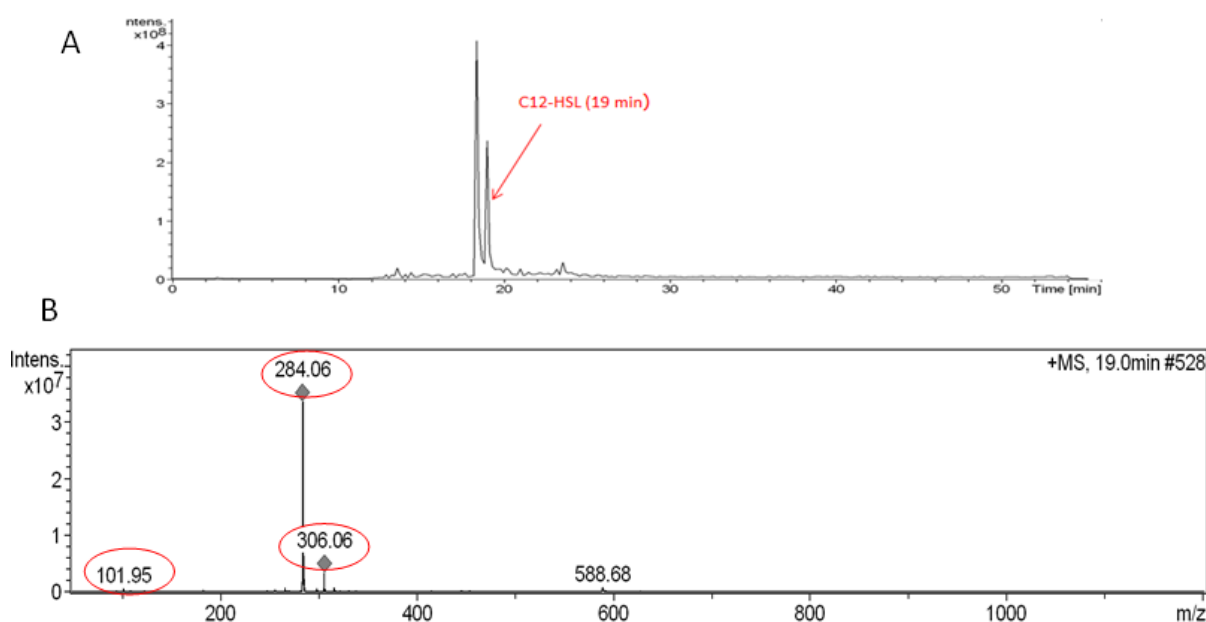


Figure 46 Chromatogramme et spectre de masse en mode +ESI du standard C₁₂-HSL. Les principaux ions produits sont les ions m/z 102, m/z 284 et m/z 306.

En résumé de cette partie de l'étude qui a porté sur la détection des AHLs produites par les bactéries marines, il est intéressant de mentionner que nous sommes parvenus dans nos conditions à identifier la C₁₂-HSL dans les extraits organiques de TC15 ; ce qui n'a pas été le cas chez TC8, TC14 et 4M6. Cette identification a été possible grâce à la méthode de détection à partir des extraits totaux de bactérie avec le biosenseur A136 et grâce aux analyses chromatographiques et spectrales. En effet, la C₁₂-HSL fait partie des AHLs détectées par A136, bien qu'à moindre degré.

Ainsi les bactéries TC8 et TC14 isolées de la rade de Toulon semblent ne pas produire d'AHL. Soit parce qu'elles sont dépourvues de système de communication de type QS impliquant les AHLs, soit parce qu'elles communiquent avec des signaux du QS autres que les AHLs. En effet, des systèmes QS impliquant des molécules autres que les AHLs ont été décrits chez diverses bactéries Gram négatif. Il s'agit des molécules appelées AI-2 pour autoinducteur de type 2 qui ont été décrites la première fois chez *Vibrio harveyi* (Bassler, 2002) et qui ont été aussi détectées chez plusieurs espèces bactériennes Gram négatif et positif telles que *E. coli*, *S. typhimurium*, *H. pylori*, *B. subtilis*, *S. aureus* (Miller & Bassler, 2001; Surette *et al.*, 1999). C'est un système QS indépendant des AHLs, qui nécessite la présence des gènes *luxS* et *luxP* chez les bactéries (Bassler *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 2002). C'est aussi le cas des quinolones qui sont de petites molécules signalétiques identifiées à ce jour chez *P. aeruginosa*, dont la production nécessite cependant un système *LasR* actif (Ortori *et al.*, 2011; Pesci *et al.*, 1999a). D'autres molécules telles que certains dérivés indoliques et peptidiques

en l'occurrence les dicétopipérazines ont également été identifiées comme molécules inductrices du QS chez certaines bactéries Gram négatif, telles que *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Enterobacter agglomerans* (Campbell *et al.*, 2009 ; Holden *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007). Selon Holden *et al.* en 1999, les dicétopipérazines sont capables d'activer certains récepteurs homologues de LuxR. C'est le cas de la souche *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1, qui produit trois dicétopipérazines comme autoinducteurs potentiels du QS (Guo *et al.*, 2011). Une recherche réalisée sur le site <http://img.jgi.doe.gov> a révélé que parmi les 53 souches appartenant au genre *Pseudoalteromonas* dont le génome a été séquencé, 47% appartenant à 12 espèces différentes possèdent au moins un gène homologue de *luxR*. Parmi elles, seule la souche *Pseudoalteromonas citrea* NCIMB semble posséder parallèlement une protéine homologue de LuxI. Aussi, une souche de la même espèce que TC8, la souche *P. lipolytica* SCSIO 04301 semble posséder une protéine transporteuse de l'autoinducteur 2 (AI-2). Chez les bactéries du genre *Paracoccus* dont fait partie 4M6, aucun gène *luxI* ou *luxS* n'a été identifié. Toutefois, le gène *luxR* a été détecté chez 2 souches, dont *Paracoccus denitrificans* PD1222 et *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 (<http://img.jgi.doe.gov>).

TC8, TC14 et TC15 sont des protéobactéries appartenant toutes au genre *Pseudoalteromonas*. Les protéobactéries marines ont beaucoup été décrites dans la littérature pour être de grands producteurs d'AHLs (Mohamed *et al.*, 2008). Mohamed et collaborateurs en 2008 ont montré dans le cadre de leur étude que 57% des protéobactéries isolées d'éponges marines étaient capables de produire au moins une AHL, par induction d'une réponse positive chez les biosenseurs. Parmi les protéobactéries, peu de *Pseudoalteromonas* ont été décrites comme produisant des AHLs. Néanmoins, quelques études ont fait état de la production d'AHLs chez des bactéries appartenant au genre *Pseudoalteromonas*. Wang et collaborateurs en 2008 ont identifié deux AHLs chez la souche *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 dont la 3-oxo-C₈-HSL et la C₁₄-HSL, par des techniques utilisant les biosenseurs et les analyses chromatographiques (Wang *et al.*, 2008). D'autres auteurs ont mis en évidence la présence d'homologues de LuxI et de LuxR chez la souche *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (Case *et al.*, 2008). En revanche, aucune AHL n'a été détectée par Wagner-Döbler *et al.* (2005) chez la souche *P. atlantica* PIC 075. Etant donné que cette étude a porté sur des bactéries marines isolées de la rade de Toulon (Méditerranée), il serait aussi intéressant d'établir des comparaisons avec des études ayant porté sur la détection d'AHLs chez d'autres bactéries aquatiques (d'eau salée ou d'eau douce), appartenant au genre *Pseudoalteromonas* ou non. Il ressort de notre étude que seule TC15 produit une AHL sur les quatre bactéries testées. Une étude précédente réalisée par (Taylor *et al.*, 2004) a montré que plus de 50% des bactéries

marines testées se sont révélées posséder un système QS actif. De plus, dans une autre étude réalisée en 2012, Garcia-Aljoro et collaborateurs ont rapporté que 85% des bactéries isolées d'organismes aquatiques appartenant à la famille des Vibrionaceae ont été capables de produire des AHLs et ainsi d'induire une réponse positive chez les différents biosenseurs utilisés dans leur étude (García-Aljaro *et al.*, 2012). Egalement, une plus récente étude réalisée en 2013 par Cuadrado-Silva et collaborateurs a rapporté la présence d'AHLs chez des bactéries marines collectées dans la baie de Santa Marta en Colombie. Parmi elles, une *Alteromonas* sp. chez qui la C₄-HSL a été détectée par le biosenseur *E. coli* pSB401 et par CCM (Cuadrado-Silva *et al.*, 2013). Outre cela, (Romero *et al.*, 2010) ont décrit un mécanisme d'inhibition plutôt que d'induction du QS chez certaines bactéries marines. Selon ces auteurs, plus de 50% des bactéries isolées des côtes marines, appartenant toutes à la classe des α -&- γ -protéobacteria étaient capables d'inhiber le QS de divers biosenseurs.

Parmi les travaux qui ont porté sur la détection d'AHLs chez les bactéries marines ou les bactéries associées aux organismes marins, peu de travaux ont abouti à l'identification des AHLs. Parmi eux, Garderès et collaborateurs en 2012 ont réussi à identifier la C₄-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL chez des bactéries associées à l'éponge *Suberites domuncula*. De toute évidence, la C₁₂-HSL est une AHL qui a rarement été identifiée chez les bactéries en général et les bactéries marines en particulier. Toutefois, les travaux réalisés par Huang *et al.* en 2007 ont abouti à l'identification de la C₁₂-HSL dans les biofilms subtidals. En outre, la C₁₂-HSL a été identifiée chez la bactérie *Brucella melitensis* (Weeks *et al.*, 2010) chez qui elle serait impliquée dans l'expression de facteurs de virulence. Par ailleurs, TC14, TC8 et TC15 sont des bactéries qui ont été décrites comme étant d'excellentes productrices de biofilm (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Le fait qu'aucune AHL n'ait été retrouvée chez TC8 et TC14 pourrait signifier que la formation de biofilm chez ces bactéries n'est pas régulée par le QS via des AHLs intrinsèques, comme cela a été décrit chez *P. aeruginosa* à travers la 3-oxo-C₁₂-HSL (Davies *et al.*, 1998) ou encore, chez *Aeromonas hydrophyla* et *Serratia liquefaciens* à travers la C₄-HSL (Labbate *et al.*, 2004; Swift *et al.*, 1999)... La formation de biofilm chez ces bactéries pourrait être régulée par des AHLs exogènes comme cela fut décrit chez la bactérie *Porphyromonas gingivalis* (Asahi *et al.*, 2010) ou encore par des mécanismes totalement indépendants du QS comme la production d'adhésines telles que les flagellines (Hawiger *et al.*, 1982), ainsi que la production d'exopolymères (O'Toole *et al.*, 2000). Dans les paragraphes suivants, nous tenterons de déterminer le rôle que pourrait jouer la C₁₂-HSL chez TC15.

4 Potentiels rôles de la C₁₂-HSL chez TC15

TC15 appartient à l'espèce *Pseudoalteromonas* sp. et est une souche très proche de la souche *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM14160, à 99,36% d'identité (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Elle forme un biofilm à partir de 24h dans différents milieux de culture marins dont le VNSS et le MB. Elle est aussi mobile par swarming, twitching et à un degré moindre par swimming (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Les phénotypes bactériens très souvent décrits dans la littérature comme étant sous la régulation du QS chez les bactéries d'origine marines sont la bioluminescence, la formation de biofilm, l'adhésion et la motilité (Dobretsov *et al.*, 2009). Sachant que TC15 est mobile et capable de former un biofilm, il a été intéressant de rechercher le rôle potentiel de la C₁₂-HSL en s'orientant vers les phénotypes formation de biofilm et motilité y compris l'adhésion, étant donné que l'adhésion est souvent une étape initiale dans la formation de biofilm. Ainsi, la C₁₂-HSL a été testée à différentes concentrations sur l'adhésion, la motilité par swimming, swarming, et twitching ainsi que la formation de biofilm de TC15.

4.1 Effet de la C₁₂-HSL sur l'adhésion de TC15

Comme mentionné ci-dessus, l'adhésion des bactéries représente dans bien de cas l'étape initiale au cours de la formation du biofilm bactérien. L'adhésion n'est toutefois pas une étape incontournable, car certaines bactéries qui ne possèdent pas une grande capacité d'adhésion sont néanmoins capables de former un biofilm. L'effet de la C₁₂-HSL sur l'adhésion de TC15 a été testé à partir du protocole du test anti-adhésion (Camps *et al.*, 2011). Son principe repose sur la capacité d'une bactérie à adhérer *in vitro* en présence de molécules exogènes. De façon générale, le test est réalisé en milieu pauvre, qui dans notre cas est l'eau de mer artificielle dans le but de ralentir la croissance bactérienne, et donc de favoriser potentiellement l'adhésion bactérienne (Camps *et al.*, 2011 ; Leroy *et al.*, 2007). Ainsi, si la C₁₂-HSL intervient dans l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion de TC15, le pourcentage d'adhésion aura tendance à augmenter en sa présence.

La Figure 47 donne les résultats de l'effet de la C₁₂-HSL sur l'adhésion *in vitro* de TC15.

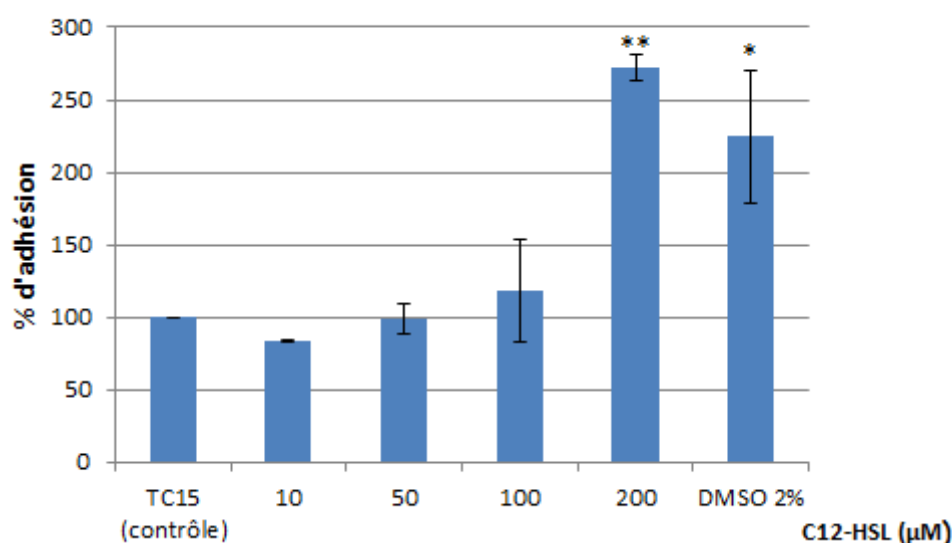


Figure 47 Effet de la C₁₂-HSL exogène sur l'adhésion de TC15 en microplaque.

Les résultats sont exprimés en % d'adhésion. Les essais marqués par des astérisques sont significativement différents par rapport au contrôle (culture de TC15 sans C₁₂-HSL) (Tukey; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$). L'expérience a été réalisée trois fois en triplicats.

Sur la Figure 47, il est constaté que jusqu'à 100 µM, la C₁₂-HSL n'a pas d'effet significatif sur l'adhésion de TC15 ($p > 0,05$). Par contre, en présence de 200 µM de C₁₂-HSL, une augmentation de l'adhésion à plus 250% est observée, mais cela doit être relativisé du fait de la présence du DMSO dans l'échantillon. En effet, en testant la bactérie seulement avec 2% de DMSO, l'adhésion est tout aussi augmentée d'à peu près 200%. Cela permet de déduire que l'augmentation de l'adhésion de TC15 en présence de 200 µM de C₁₂-HSL serait en réalité due à la présence de 2% de DMSO dans l'échantillon. En effet, 2% de DMSO représentent la plus grande concentration de DMSO qui a servi à solubiliser la C₁₂-HSL. Le traitement de la bactérie seulement avec la plus grande concentration du solvant testé permet de déterminer l'effet du solvant. Selon Camps et collaborateurs en 2011, la plus forte concentration de DMSO tolérée par certaines bactéries de la collection de Toulon (TC) serait estimée à environ 2% (Camps *et al.*, 2011).

Dans cette expérimentation, il s'est avéré que 2% de DMSO est non seulement non toxique pour TC15, mais favorise en plus son adhésion ; ce qui représente un résultat un peu surprenant, car la plupart des solvants organiques reconnus pour leur effet plus ou moins toxique ne sauraient favoriser l'adhésion d'une bactérie.

Il faut noter que TC15 est une bactérie qui de toute évidence ne possède pas une très bonne capacité d'adhésion. De façon arbitraire, il est admis qu'une bactérie adhère adéquatement lorsque son ratio (indicateur de l'adhésion bactérienne) est supérieur ou égal à 2,5 (Camps *et*

al., 2011). Le ratio est égal au rapport entre l'IF de la bactérie et l'IF du témoin milieu sans bactérie. Or dans le cas de TC15, le ratio est égal à 1, valeur largement inférieure au seuil d'adhésion fixé. Ce résultat est identique à celui obtenu dans la thèse Brian-Jaisson en 2014. En résumé, TC15 n'adhérerait pas assez contrairement aux autres bactéries de la même espèce, en l'occurrence *P. lipolytica* TC8 (Camps *et al.*, 2011) et *Pseudoalteromonas* sp. D41 (Leroy *et al.*, 2007) et ce, malgré la présence de la C₁₂-HSL qu'elle semble produire selon nos résultats.

L'ensemble de ces résultats suggère que la C₁₂-HSL ne favorise pas l'adhésion de TC15.

4.2 Effet de la C₁₂-HSL sur la mobilité de TC15

Dans un second temps, la C₁₂-HSL a été testée sur les différentes formes de mobilité effectuées par TC15, à savoir le swimming, le swarming et le twitching. En effet, Brian-Jaisson *et al.* en 2014 ont montré que TC15 était capable de swimming, de swarming et de twitching. La C₁₂-HSL a donc été testée à 50 µM sur les différentes formes de mobilité, afin de vérifier son éventuelle implication dans l'une ou les autres formes de mobilité rencontrées chez TC15.

Ainsi pour le swimming, les bactéries ont été déposées sur gélose VNSS avec 0,3% d'agar, 0,5% d'agar pour le swarming et 1,5% d'agar pour le twitching. Les résultats sont présentés sous forme de graphique par la Figure 48 a, b et c et sous forme d'images par la Figure 49.

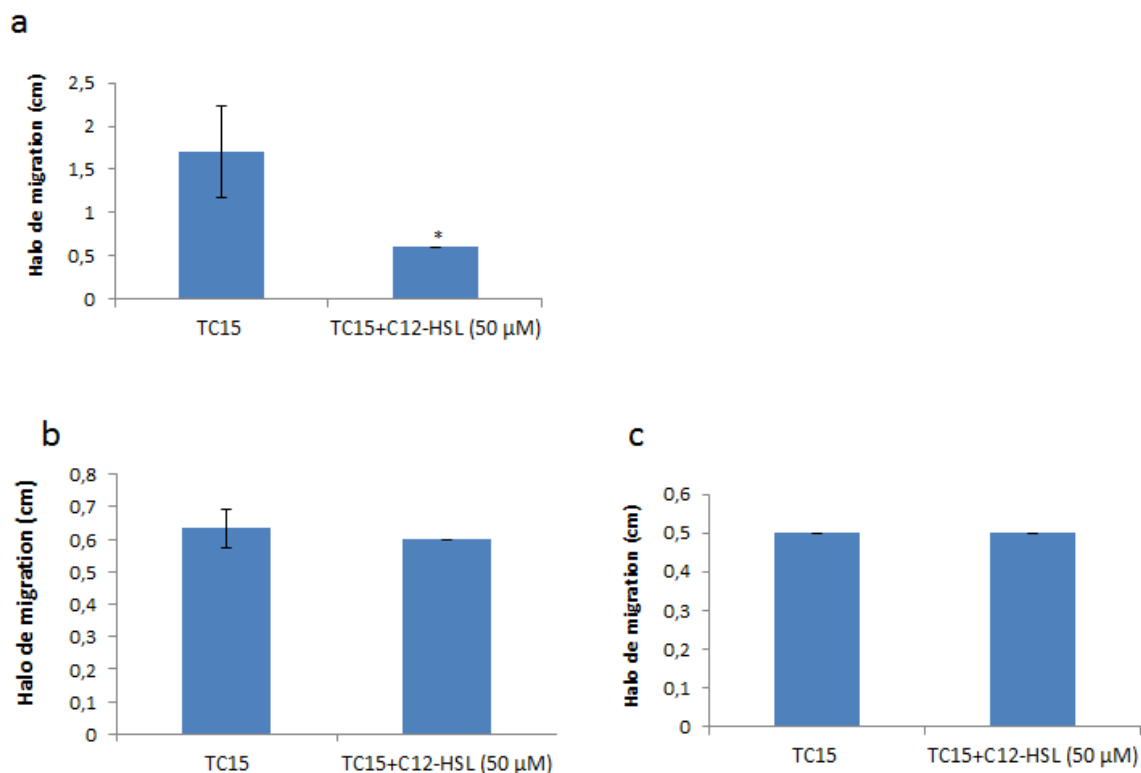


Figure 48 Tests de motilité de TC15 en présence de la C₁₂-HSL.

Le halo de migration correspond au diamètre de la zone circulaire de la croissance bactérienne (a) motilité par swimming (b) motilité par swarming (c) motilité par twitching. Chaque mesure a été répétée trois fois à partir de trois cultures indépendantes. En (a) le test marqué avec un astérisque est significativement différent ($p < 0,05$) par rapport au control (TC15 sans AHL). En (b) et en (c), il n'y a pas de différence significative avec le contrôle.

Le diamètre de migration de TC15 pour le swimming, le swarming et le twitching est respectivement de 1,5 cm, 0,6 cm et 0,5 cm. La présence de la C₁₂-HSL à 50 µM semble ne pas avoir d'effet ni sur le swarming, ni sur le twitching de TC15 (Figure 48 b et c). Par contre, elle semble réduire de manière significative le swimming (Figure 48a).

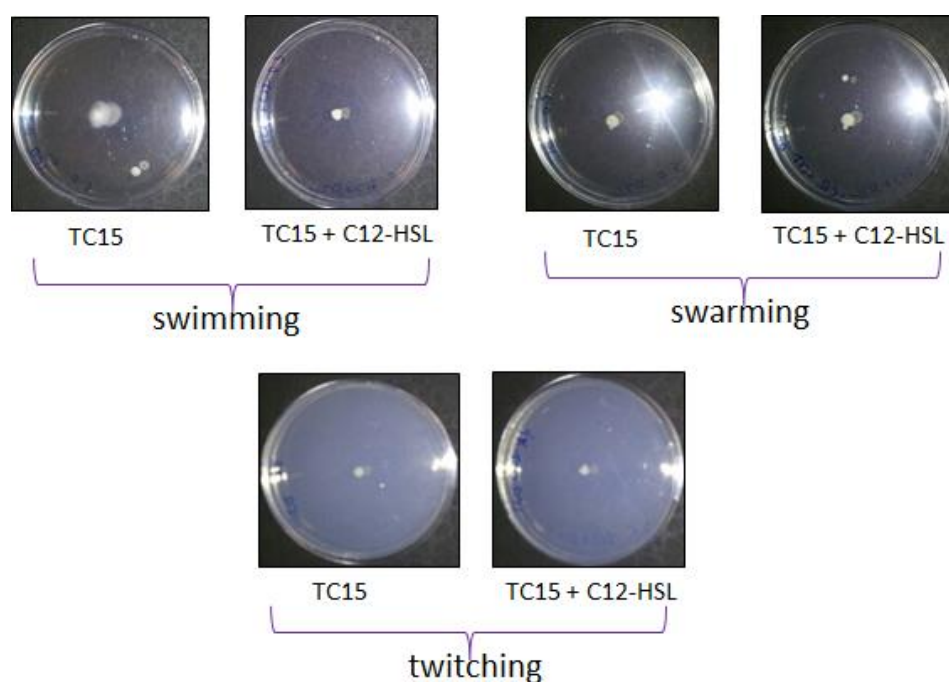


Figure 49 Images des tests de motilité de TC15 en présence de la C₁₂-HSL.

De façon générale, les trois formes de mobilité se réalisent grâce aux appendices cellulaires tels que les flagelles et les pili de type IV. Le swimming et le swarming impliquent les flagelles qui permettent aux bactéries d'approcher les surfaces au cours de l'étape précoce de formation de biofilm, tandis que le twitching implique l'action des pili de type IV qui interviennent dans la maturation du biofilm (Jarrell & McBride, 2008). Selon les travaux de Brian-Jaisson et collaborateurs en 2014, TC15 serait un moyen 'swimmer' et 'swarmer' mais plutôt un bon 'twitcher'. Puisque chez certaines bactéries le swimming et le swarming interviennent dans le processus d'adhésion, cela pourrait donc expliquer le fait que TC15 n'adhère que peu, mais est capable de former du biofilm. TC15 aurait donc un comportement contraire à celui d'une autre souche de la collection de Toulon, la souche *Polaribacter* sp. TC5, qui elle adhère bien en microplaque mais forme très peu de biofilm *in vitro* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Camps *et al.*, 2011). Chez certaines bactéries, le swarming, le twitching et le swimming sont dépendants du QS. C'est le cas de *P. aeruginosa* chez qui les systèmes LasR/3-oxo-C₁₂-HSL et RhIR/C₄-HSL contrôlent le swarming et le twitching (Glessner *et al.*, 1999; Shrout *et al.*, 2006). Aussi, Chez *Serratia liquefaciens* MG1, le système QS SwrR/C₄-HSL participerait à l'expression du swarming (Givskov *et al.*, 1998b). C'est également le cas de *Burkholderia cepacia* H111, avec l'implication du système CepR/C₈-HSL dans le

swarming (Huber *et al.*, 2001) et de *Yersinia enterocolitica* 90/54, chez qui le système YenI/3-oxo-C₆-HSL/C₆-HSL contrôle le swimming et le swarming (Atkinson *et al.*, 2006).

Le résultat de la Figure 49 semble confirmer que la C₁₂-HSL bloquerait la migration par swimming de la bactérie. Le fait que TC15 possède une faible capacité d'adhésion qui pourrait être liée à sa faible capacité à nager et puisque la C₁₂-HSL influence encore plus négativement ce résultat, il serait intéressant d'invalider le gène de la synthèse à l'origine de la C₁₂-HSL de façon à vérifier si l'adhésion et la nage en serait plus efficace. La littérature fait très peu cas d'AHLs qui inhibent la mobilité des bactéries en général et le swimming en particulier. Dans la majeure partie des cas, la motilité des bactéries est inhibée par des molécules imitant les AHLs comme les dérivés des furanones halogénées chez *Serratia liquefaciens* MG1 et chez *E. coli* XL1-blue (Rasmussen *et al.*, 2000 ; Ren *et al.*, 2001).

Il ressort de cette expérimentation portant sur l'effet que pourrait avoir la C₁₂-HSL commerciale sur les différentes formes de mobilités exercées par TC15 que la C₁₂-HSL produite par TC15 n'a d'effet ni agoniste ni antagoniste sur le swarming et le twitching, mais aurait un effet antagoniste sur le swimming à 50 µM.

4.3 Effet de la C₁₂-HSL sur la formation de biofilm de TC15

La formation de biofilm par les bactéries est un phénomène couramment rencontré en environnement marin. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'implication du QS dans le processus de formation de biofilm chez les bactéries (Davies *et al.*, 1998; Kjelleberg & Molin, 2002 ; Parsek & Greenberg, 2005). L'objectif ici est de vérifier si la C₁₂-HSL est impliquée dans la formation de biofilm chez TC15. Dans les deux premiers chapitres de la thèse, les différentes méthodes pouvant servir à l'étude des biofilms bactériens ont été décrites. Parmi ces méthodes, le *BioFilm Ring Test*[®] (BFRT[®]) permet de suivre et de quantifier la formation de biofilm en microplaque. Ce test a donc été utilisé pour vérifier l'effet de la C₁₂-HSL sur la formation de biofilm de TC15. La question est de savoir si la C₁₂-HSL exogène induit la formation d'un biofilm plus conséquent lorsque la souche est stimulée par cette molécule, ou au contraire elle l'inhibe. Il a été reportée par exemple que la 3-oxo-C₁₂-HSL induisait la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Davies *et al.*, 1998). La Figure 50 donne les résultats de l'effet de la C₁₂-HSL sur la formation de biofilm de TC15 par le BFRT en milieu MB. La C₁₂-HSL a donc été testée à différentes concentrations dont 50, 100 et 200 µM.

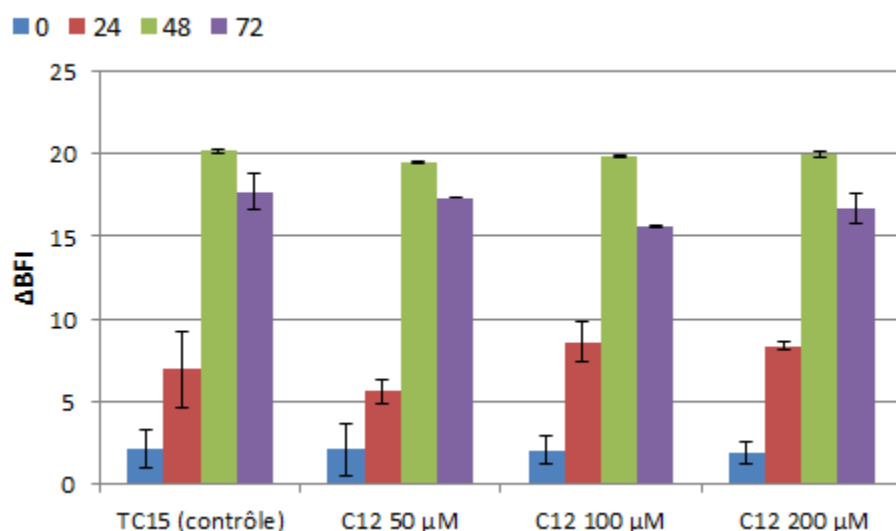


Figure 50 Cinétique de formation de biofilm de TC15 en présence de la C₁₂-HSL. Les résultats sont exprimés en ΔBFI. Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicats. Aucun essai n'est différent du contrôle (culture de TC15 sans AHLs) au temps donné ($p < 0,05$).

La C₁₂-HSL semble ne pas avoir d'effet significatif sur la formation de biofilm de TC15 aux différentes concentrations testées. Le choix du milieu MB pour la culture des bactéries en biofilm a été fait en référence aux résultats de Brian-Jaisson *et al.* en 2014, qui ont montré que les bactéries de la rade de Toulon forment plus de biofilm en MB qu'en VNSS. La Figure 50 montre qu'à partir de 24h d'incubation, un biofilm est déjà en cours de formation chez TC15 ($\Delta\text{BFI} > 2$). A 48h d'incubation, le biofilm devient mature ($\Delta\text{BFI} > 20$). Le ΔBFI est identique avec ou sans apport de C₁₂-HSL exogène.

Plusieurs travaux ont décrit l'implication du QS dans la formation de biofilm chez diverses bactéries (Parsek & Greenberg, 2005). A l'opposé, (Hammer & Bassler, 2003) ont décrit un effet plutôt répressur du QS dans la formation de biofilm chez la souche pathogène *V. cholerae*. Selon ces auteurs, *V. cholerae* aurait tendance à réprimer à forte densité cellulaire sa formation de biofilm ainsi que sa virulence contrairement à la plupart des bactéries. Nos résultats mettent en évidence le fait que bien que présent chez une souche bactérienne, le système QS pourrait n'avoir aucun effet sur la formation de biofilm. De manière similaire, Davies et collaborateurs (1998) ont montré que bien qu'ayant été identifié chez *P. aeruginosa*, le système QS *rhl* impliquant la C₄-HSL ne contrôle pas la formation de biofilm chez cette bactérie. Bien que n'étant pas impliquée dans la formation de biofilm chez TC15, la C₁₂-HSL pourrait jouer un rôle dans d'autres étapes, telles que la dispersion du biofilm. En effet, il existe des preuves que pour certaines bactéries, le QS contrôle la dispersion ou l'agrégation

bactérienne. Cela a été vérifié chez la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris*, chez qui le QS conduit une agrégation et à la dispersion des cellules du biofilm (Dow *et al.*, 2003).

Il ressort de cette partie de notre étude que la C₁₂-HSL ne contrôle ni l'adhésion, ni la motilité, ni la formation de biofilm chez TC15. Ce constat est tout à l'opposé de celui de la bactérie *S. liquefaciens* MG1, chez qui la C₄-HSL contrôle les gènes essentiels à l'adhésion, le swarming et la formation de biofilm (Labatte *et al.*, 2001) (comm. pers. de Labatte M.). Chez la bactérie *Brucella melitensis*, la C₁₂-HSL contribuerait à la régulation de l'expression des mécanismes de virulence et au contrôle de la capacité de la bactérie à survivre à l'intérieur de la cellule hôte (Weeks *et al.*, 2010). Ainsi, la C₁₂-HSL chez TC15 pourrait être impliquée dans la régulation de phénotypes autres que l'adhésion, la formation de biofilm et la mobilité. La littérature fait cas de bactéries qui produisent des AHLs dont le rôle reste pour le moment indéterminé. Nous pouvons citer entre autres la C₆-HSL et la C₈-HSL chez les bactéries marines *Roseobacter* spp. et *Marinobacter* sp. (Gram *et al.*, 2002), la C₆-HSL et 3-oxo-C₆-HSL chez la *Yersinia enterocolitica* (Throup *et al.*, 1995), la 3-oxo-C₁₂-HSL chez *Vibrio anguillarum*, qui a été bien identifiée mais dont le rôle n'a pas été déterminé (Milton *et al.*, 1997) et les AHLs 3-oxo-C₁₀-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL et 3-oxo-C₁₄-HSL qui ont été identifiées chez *Y. enterocolitica* 90/14 et qui ne participent pas à la mobilité de la bactérie (Atkinson *et al.*, 2006). La C₁₂-HSL pourrait également ne pas être biologiquement active chez la TC15. En effet, il a été rapporté que certaines protéines homologues de LuxI peuvent produire une variété d'AHLs qui ne se révèlent toutes biologiquement actives (Waters & Bassler, 2005). Cela a bien été vérifié chez *A. tumefaciens* avec TraI qui produit plus d'une AHL dont le rôle biologique n'a pas été clairement élucidé excepté celui de la 3-oxo-C₈-HSL (Zhu *et al.*, 1998). C'est aussi le cas chez la bactérie *S. meliloti* Rm1021 qui produit plusieurs AHLs à chaînes courtes comprenant la C₈-HSL dont l'activité biologique n'a pas encore été déterminée (Marketon *et al.*, 2002).

5 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion des bactéries marines

Dans cette étude, aucune AHL intrinsèque n'a été détectée chez les bactéries marines TC8, TC14 et 4M6. Toutefois, des études précédentes ont montré que ces bactéries étaient capables d'adhérer et de former un biofilm (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Camps *et al.*, 2011 ; Grasland *et al.*, 2003). De ce fait, il s'est avéré intéressant de tester la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis des molécules exogènes, en l'occurrence des AHLs exogènes dans le but de déterminer des molécules biologiques à effet anti adhésion. Dix AHLs exogènes

disponibles dans le laboratoire ont été testées à des concentrations variant de 5 à 200 μM sur la capacité à adhérer *in vitro* des trois bactéries, TC8, TC14 et 4M6, en utilisant le protocole anti-adhésion.

5.1 Sur l'adhésion de TC8

Dix AHLs exogènes ont été testées sur l'adhésion de TC8. Seuls les résultats des AHLs dont les essais ont été réalisés trois fois, à partir de trois cultures indépendantes ont été présentés dans la Figure 51.

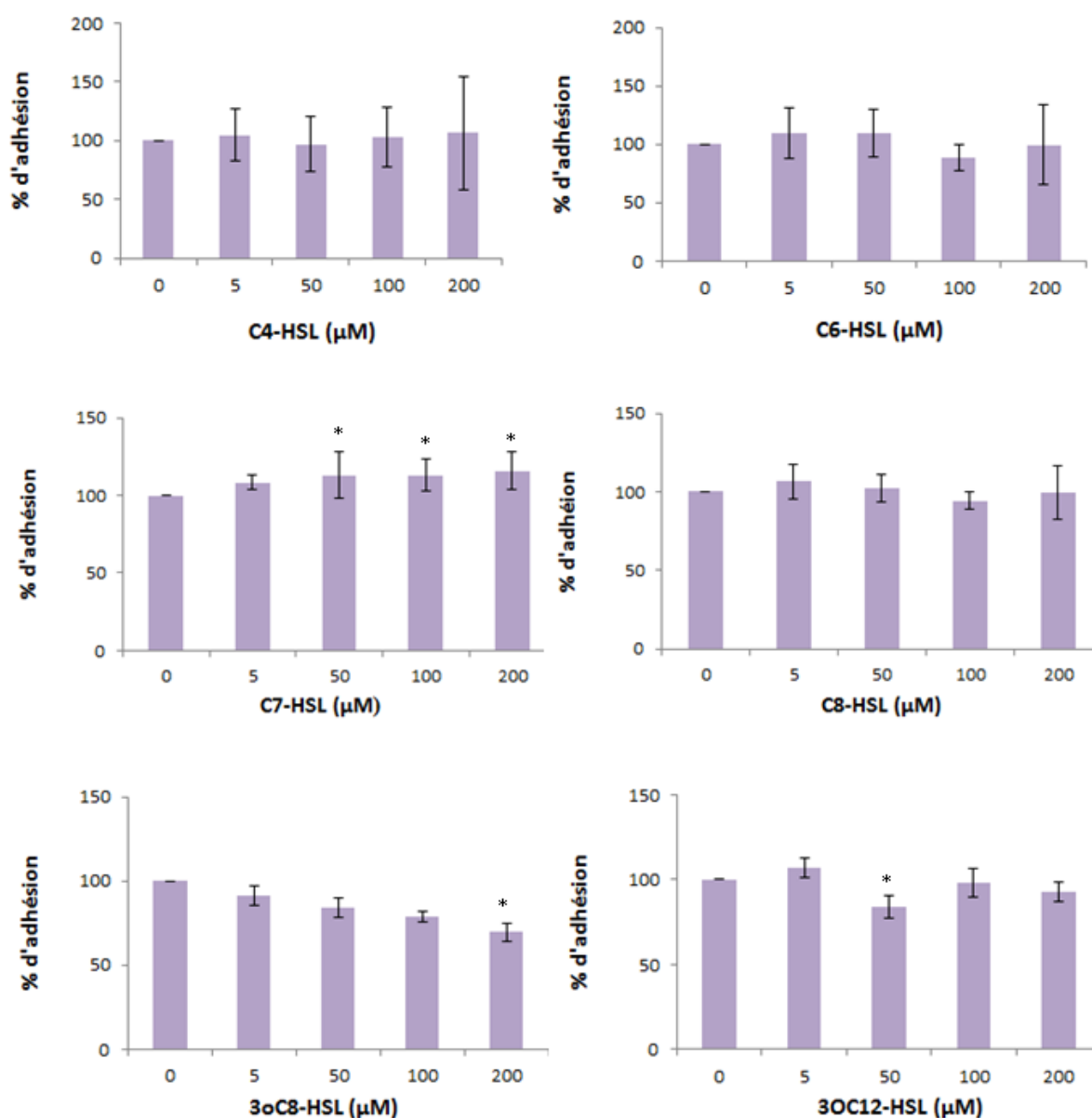


Figure 51 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion de TC8.

Les tests ont été réalisés trois fois en triplicats, en microplaques noires. Les essais marqués par des astérisques sont significativement différents ($p < 0,05$) du témoin (culture de TC8 sans AHLs, 0 μM).

L'espèce *Pseudoalteromonas lipolytica* a été décrite pour la première fois par Xu et collaborateurs en 2010, comme une nouvelle espèce du genre *Pseudoalteromonas* (Xu *et al.*, 2010). Ceci explique bien pourquoi très peu d'études ont été réalisées sur cette espèce. Dans le laboratoire MAPIEM, *P. lipolytica* TC8 a été isolée le 13 Février 2008 sur un support en silicone ELP08/55554/13 immergé pendant 6h dans le port de Mourillon (Toulon) (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). TC8 fait partie des bactéries de la collection de Toulon avec l'un des meilleurs scores d'adhésion et de formation de biofilm (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Camps *et al.*, 2011).

La Figure 51 montre que de toutes les AHLs testées sur la capacité d'adhésion de TC8, seule la C₇-HSL augmente faiblement mais de manière non significative l'adhésion de TC8. Toutefois, ce léger effet agoniste semble être identique aux différentes concentrations testées. TC8 ne pourrait pas produire la C₇-HSL pour deux raisons. D'une part, parce que la C₇-HSL n'a pas été détectée dans les extraits de TC8 au cours des analyses chromatographiques, d'autre part parce que la C₇-HSL qui est une AHL à nombre de carbones impair n'est pas naturellement produite par les bactéries et très répandue dans l'environnement. En effet, les bactéries ne synthétiseraient en majorité que des AHLs à nombre de carbones paire (Fuqua & Greenberg 2002). Toutefois, certaines bactéries comme *Serratia marcescens* semblent produire une variété d'AHLs dont fait partie la C₇-HSL (Hornig *et al.*, 2002). Nous pensons que TC8 serait tout simplement sensible à la C₇-HSL qui favorise légèrement son adhésion. Par ailleurs, la 3-oxo-C₈-HSL diminue l'adhésion de TC8 avec un effet significatif à partir de 200 µM. De plus, cet effet inhibiteur semble être dépendant de la concentration testée. Les résultats relatifs à la détection des AHLs avec les biosenseurs ont indiqué que TC8 ne synthétise pas la 3-oxo-C₈-HSL. Néanmoins, TC8 pourrait être sensible à certaines AHLs exogènes qui régulent sa capacité d'adhérer. En effet, les bactéries sont continuellement en compétition *in situ* les unes les autres par la sécrétion de molécules y compris celles du QS. A cet effet, certaines bactéries sont capables de produire des AHLs qui inhibent l'adhésion ou la formation de biofilm des autres bactéries. C'est le cas de l'analogue AHL, la 3-oxo-C₁₂-(2-aminocyclohexanol) qui diminue fortement la formation de biofilm de *P. aeruginosa* (Smith *et al.*, 2003) et de certains autres analogues AHLs qui diminuent le biofilm de *Porphyromonas gingivalis* (Asahi *et al.*, 2010).

5.2 Sur l'adhésion de TC14

Tout comme pour TC8, dix AHLs ont été testées sur l'adhésion de *P. ulvae* TC14 en microplaque. Les résultats sont présentés dans la Figure 52.

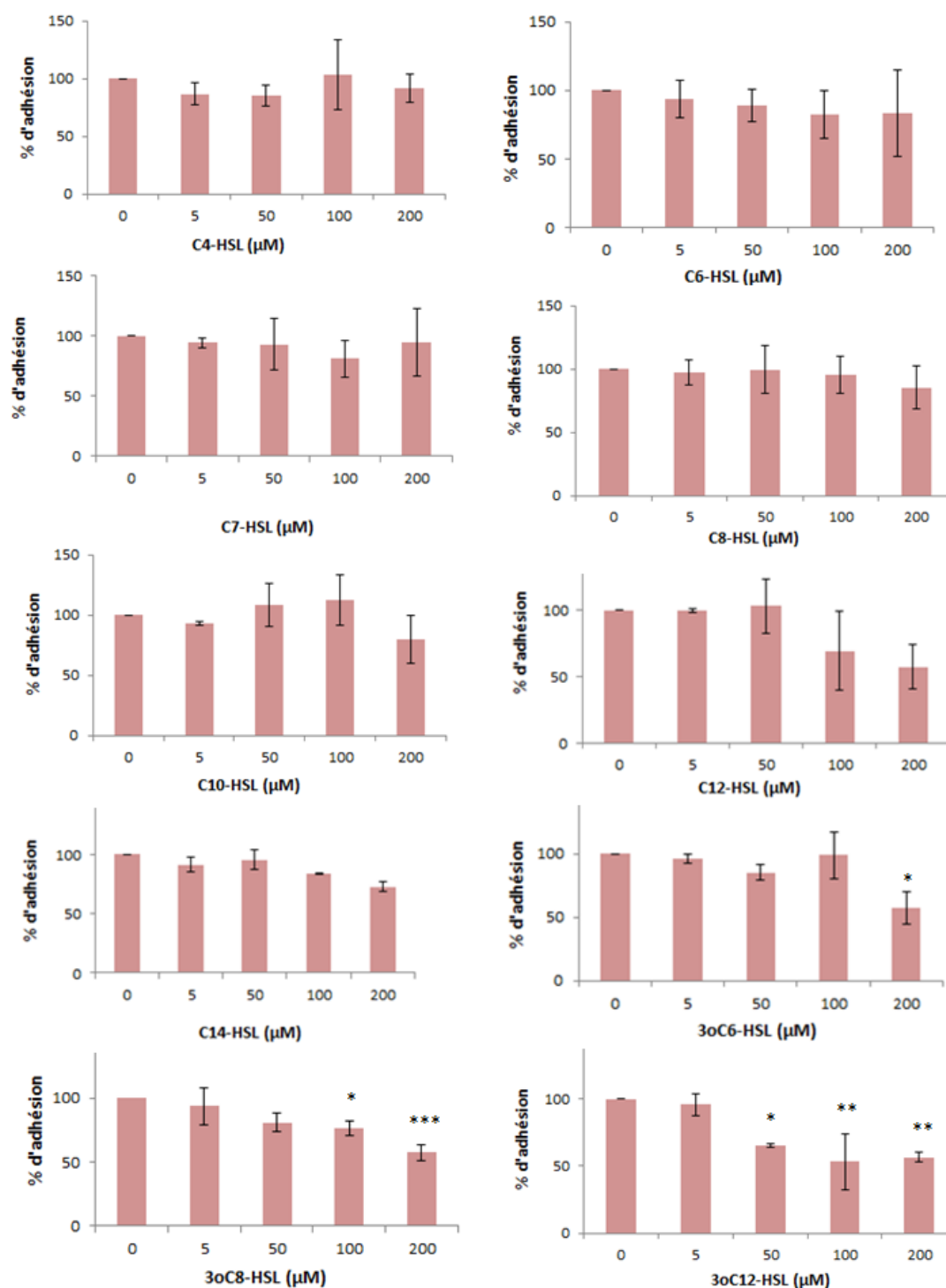


Figure 52 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion de TC14.

Les tests ont été réalisés trois fois en triplicats en microplaques noires. Les essais marqués par des astérisques sont significativement différents ($p < 0,05$) du témoin (culture de TC14 sans AHLs, 0 μM).

La souche *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 a largement été décrite dans le premier chapitre de cette thèse. Très brièvement, cette souche a été isolée le 10 Juin 2010 au port militaire de Toulon sur une plaque de silicone fluoré ELP08/55554/13. Elle possède une très bonne capacité d'adhésion avec un ratio d'adhésion (rapport de l'IF de TC14 et l'ASW seul) pouvant parfois atteindre 20.

Il ressort de la Figure 52 que parmi toutes les AHLs testées sur l'adhésion de TC14, les dérivés oxo-AHLs montrent un effet inhibiteur très intéressant avec un effet très prononcé pour la 3-oxo-C₁₂-HSL qui réduit presque de moitié l'adhésion à partir de 50 µM. La 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₆-HSL affichent un effet un peu moindre, respectivement à 100 µM et à 200 µM. Les autres AHLs exogènes testées ne montrent pas d'effet significatif ($p < 0,05$) sur l'adhésion de TC14.

Très peu d'études ont fait cas d'AHLs qui inhibent directement l'adhésion ou la formation de biofilm de bactéries. La plupart du temps, la formation des biofilms bactériens est inhibée soit à la suite de mutations réalisées dans les gènes impliqués dans le QS, soit par des molécules presque structurellement identiques aux AHLs qui miment les AHLs, telles que les furanones halogénées (Hentzer *et al.*, 2002), soit encore par des analogues AHLs non naturelles (Asahi *et al.*, 2010; Geske *et al.*, 2005). Ce résultat reste intéressant, car il montre que des bactéries qui ne pas produisent d'AHL pourraient toutefois être sensibles à des AHLs exogènes, qui peuvent être produites par des bactéries voisines dans l'habitat naturel. En effet, les AHLs 3-oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL et 3-oxo-C₁₂-HSL sont des AHLs très souvent produites par de nombreuses espèces de bactéries dans l'environnement (Dobretsov *et al.*, 2009; Miller & Bassler, 2001).

5.3 Sur l'adhésion de 4M6

La souche *Paracoccus* sp. 4M6 est une bactérie du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine (LBCM) de l'Université de Bretagne-Sud. Elle a été isolée dans le Golfe du Morbihan sur un support en verre (Dheilly *et al.*, 2010; Grasland *et al.*, 2003). C'est une bactérie référence d'adhésion, de motilité et de formation de biofilm qui a été utilisée comme contrôle positif dans plusieurs études se rapportant à l'adhésion (Camps *et al.*, 2011 ; Othmani *et al.*, 2014), à la formation de biofilm (Klein *et al.*, 2011) et à la motilité (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Dans notre étude, elle a été utilisée comme référence négative dans la production de molécules AHLs (Grasland comm. pers.). Les mêmes AHLs exogènes ont été testées à

différentes concentrations sur l'adhésion de 4M6 en microplaque. Les résultats sont présentés dans la Figure 53.

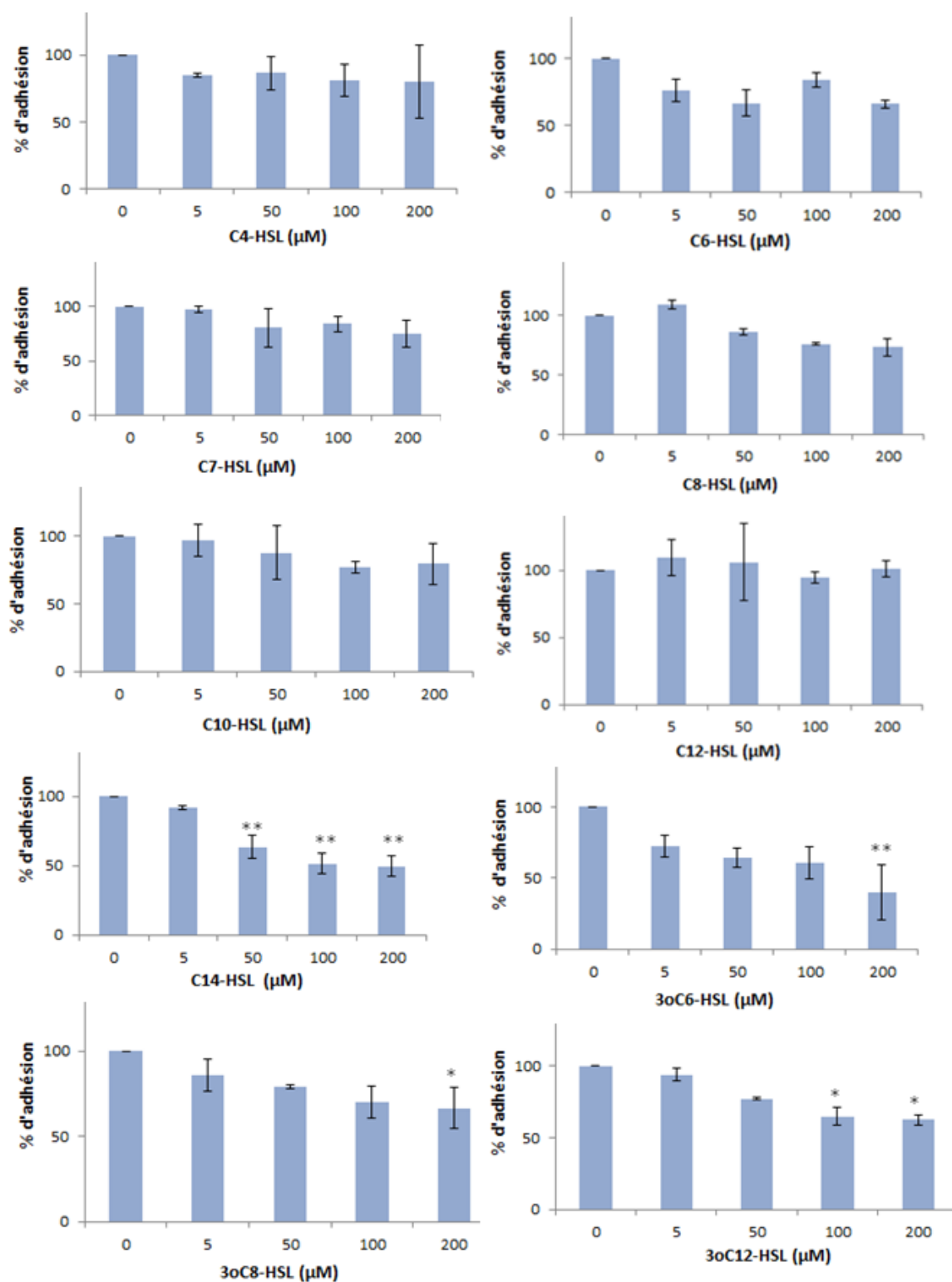


Figure 53 Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion de 4M6.

Les tests ont été réalisés trois fois en triplicats en microplaques noires. Les essais marqués d'astérisques sont significativement différents ($p < 0,05$) du témoin (culture de 4M6 sans AHLs, 0 µM).

Paracoccus sp. 4M6 possède la meilleure capacité d'adhésion de toutes les bactéries testées en adhésion dans cette étude, avec une moyenne de ratio supérieure à 50. Quatre AHLs exogènes parmi les dix testées ont montré un effet inhibiteur intéressant sur l'adhésion de 4M6, sans affecter sa croissance. Il s'agit de la C₁₄-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL, avec un effet plus significatif pour la C₁₄-HSL puisqu'elle s'est montrée active à partir de 50 µM et pour la 3-oxo-C₆-HSL qui est active à 200 µM. Certains auteurs ont mentionné un effet toxique de la C₁₄-HSL sur la souche *P. gingivalis* (Komiya-Ito *et al.*, 2006). Chez 4M6, aucun effet toxique de la C₁₄-HSL n'a été observé. Il est constaté par ailleurs qu'excepté la C₁₄-HSL, les AHLs qui inhibent l'adhésion de 4M6 sont les mêmes qui inhibent l'adhésion de TC14. Comme cela a été déjà suggéré plus haut, il s'agit des principales AHLs synthétisées par de nombreux organismes. Ces bactéries ne seraient donc pas insensibles à des molécules de communication telles que les AHLs qui pourraient être synthétisées par des bactéries voisines au sein d'un écosystème.

Bien que les bactéries marines TC8, TC14 et 4M6 semblent ne pas produire d'AHL intrinsèque, il a été intéressant de vérifier si certaines AHLs exogènes n'auraient pas d'effet agoniste ou antagoniste sur leur adhésion. Les résultats ont montré que de façon générale, les dérivés oxo-AHLs inhibaient l'adhésion des trois bactéries. Dans la littérature, des analogues d'AHLs ont été cités comme étant des inhibiteurs à la fois de l'adhésion et de la formation de biofilm des bactéries. Nous citons la 3-oxo-C₁₂-(2-aminocyclo-hexanol) qui inhibe le biofilm de *P. aeruginosa* (Smith *et al.*, 2003) et des analogues respectifs de la C₆-HSL et de la C₁₂-HSL qui diminuent le biofilm de *P. gingivalis* (Asahi *et al.*, 2010). En plus des analogues AHLs, les molécules inhibitrices de l'adhésion et du biofilm les plus décrites sont les furanones halogénées, isolées de l'algue rouge *D. pulchra* et leurs analogues synthétiques qui ont montré un effet inhibiteur remarquable sur la colonisation de l'algue par des bactéries aussi bien que d'autres organismes marins. Il est bien connu que les furanones halogénées sont de petites molécules très proches des AHLs dans la structure. De ces observations, nous pouvons penser que les furanones halogénées pourraient aussi inhiber l'attachement des bactéries objets de cette étude.

Cette expérimentation a permis non seulement de confirmer que les bactéries TC8, TC14 et 4M6 possèdent chacune une très bonne capacité d'adhésion mais a aussi permis de mettre en évidence l'activité anti-adhésion des molécules du QS. Ainsi, les AHLs qui sont des molécules couramment impliquées dans les processus bactériens tels que l'adhésion, la formation de biofilm et la motilité, peuvent à l'opposé les inhiber. Outre cela, un fait

surprenant durant ces travaux a été l'effet pro-adhésif du DMSO chez TC15. Ce résultat reste étrange et difficile à interpréter d'autant plus qu'il n'a pas été observé chez les autres bactéries TC8, TC14 et 4M6 et chez aucune autre bactérie dans la littérature.

6 Détermination des CE₅₀ des AHLs exogènes

La CE₅₀ correspond à la concentration effective qui permet d'inhiber de 50%, l'adhésion bactérienne. Elle a été calculée pour toutes les AHLs exogènes qui ont montré un effet inhibiteur significatif sur l'adhésion des trois bactéries. Le calcul de la CE₅₀ a été effectué à partir du logiciel GraphPadPrism 5®. Il s'agit de la 3-oxo-C₈-HSL pour TC8, la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL pour TC14, ainsi que la C₁₄-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL pour 4M6. Le Tableau 23 donne la valeur des CE₅₀ des AHLs exogènes concernées pour chaque bactérie.

Tableau 23 CE₅₀ de l'inhibition d'adhésion de certaines AHLs exogènes

Souches AHLs exogènes	TC8	TC14	4M6
C ₁₄ -HSL	-	-	143 ± 7 µM
3-oxo-C ₆ -HSL	-	333,5 ± 25 µM	157,0 ± 12 µM
3-oxo-C ₈ -HSL	1438 ± 20 µM	195,2 ± 10 µM	-
3-oxo-C ₁₂ -HSL	-	211,1 ± 51 µM	403,3 ± 22 µM

- : pas d'effet significatif

7 Effet de quelques AHLs sur la motilité de 4M6

Chez 4M6, la C₁₄-HSL et la 3-oxo-C₆-HSL ont montré chacune un effet anti adhésion significatif, avec des CE₅₀ respectifs de 143 ± 7 µM et de 157 ± 12 µM. Etant donné que l'adhésion bactérienne est très souvent dirigée par des appendices cellulaires, il a paru intéressant de tester l'effet de ces deux AHLs sur la mobilité par swimming et par swarming de 4M6. En effet, quoique peu impliqués dans le maintien du biofilm, les pili de type I et les flagelles sont essentiels à l'attachement initial des bactéries aux surfaces, tandis que les pili de type IV jouent un rôle dans le déplacement des bactéries sur les surfaces (Davey & O'toole, 2000). Pour cette raison, les deux AHLs ont été testées sur la mobilité par swimming et par swarming de 4M6 à 50 µM et à 100 µM. 4M6 a été décrite comme possédant une bonne capacité de swimming et de swarming. Elle a été utilisée comme référence positive dans des tests de mobilité par swarming et swimming (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Grasland *et al.*,

2003). La mobilité par twitching quant à elle n'a pas été testée, car 4M6 n'est pas reconnue comme un excellent 'twitcher' (Brian-Jaïsson *et al.*, 2014). La Figure 54 donne les résultats de l'effet de la C₁₄-HSL et de la 3-oxo-C₆-HSL sur le swimming et le swarming de 4M6 en milieu VNSS après 48h d'incubation.

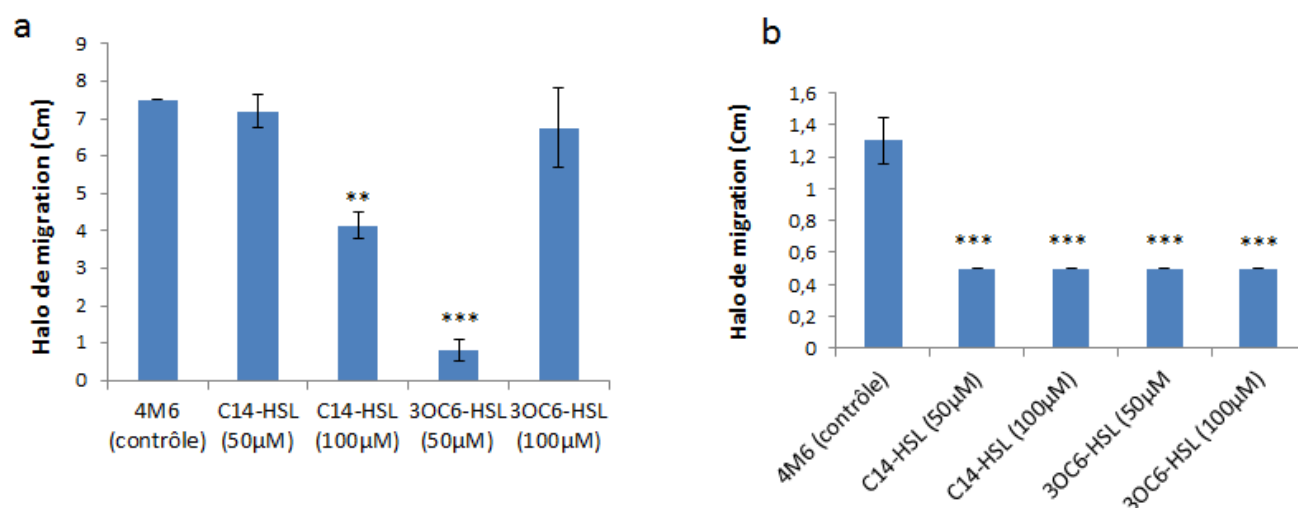


Figure 54 Effet des AHLs exogènes sur la motilité de 4M6. Chaque type de mesure a été effectué trois fois à partir de trois cultures indépendantes de 4M6 (a) motilité par swimming (b) motilité par swarming. Les essais marqués par des astérisques sont significativement différents du contrôle (culture de 4M6 sans AHLs).

Il ressort de la Figure 54b que les deux AHLs exogènes testées bloquent le swarming de la bactérie quelle que soit la concentration (de 1,3 à 0,5 cm). Il semble qu'il n'y ait pas d'effet concentration des AHLs sur ces deux phénotypes. Par ailleurs, nous n'avons pas d'explication concernant le fait que la 3-oxo-C₆-HSL ait un effet très significatif à 50 µM et pas d'effet à 100 µM sur la nage de 4M6. D'autre part, il serait intéressant à l'avenir de tester l'effet potentiellement synergique des deux molécules (C₁₄-HSL et 3-oxo-C₆-HSL) sur ces phénotypes. Le fait que les deux AHLs affectent le swarming de 4M6, pourrait expliquer leur effet sur l'adhésion chez la bactérie. La C₁₄-HSL ou la 3-oxo-C₆-HSL empêcheraient la production de flagelles et/ou de biosurfactants, essentiels au swarming et donc à l'attachement aux surfaces. En effet, chez certaines bactéries comme *Serratia liquefaciens*, le swarming est souvent dû à de petites molécules appelées biosurfactants qui favorisent l'adhésion bactérienne, et dont la production pourrait être régulée par le QS (Eberl *et al.*, 1999). La littérature décrit divers facteurs qui seraient à l'origine de l'inhibition du swarming chez les bactéries (Daniels *et al.*, 2004). Il peut s'agir de la protéine RmsA qui inhibe le swarming de

Serratia marcescens par inhibition de l'expression de l'homologue de LuxI (Ang *et al.*, 2001), de la dicétopipérazine (L-Pro-L-Tyr) produite par *E. coli*, qui empêche le swarming de *S. liquefaciens* (Holden *et al.*, 1999) ou encore, des furanones halogénées (Givskov *et al.*, 1996). Par ailleurs, chez une autre souche pigmentée de *S. marcescens* appelée SS-1, le swarming est inhibé par la répression de l'activité du récepteur QS SpnR par une AHL non native, la 3-oxo-C₈-HSL (Horng *et al.*, 2002).

La 3-oxo-C₆-HSL et la C₁₄-HSL ont chacune montré un effet inhibiteur intéressant à la fois sur le swimming et le swarming de 4M6 ; ce qui pourrait bien expliquer le fait qu'elles diminuent significativement l'adhésion de la bactérie.

8 Conclusion

La méthode de détection des AHLs à partir des biosenseurs et par les analyses chromatographiques a permis d'identifier la C₁₂-HSL chez TC15, tandis qu'aucune AHL n'a pu être identifiée chez TC8, TC14 et 4M6, dans nos conditions de culture, d'extraction et de chromatographie. Ces résultats ont été fournis en tenant compte du fait que le pH et la durée de culture de chaque bactérie ont été préalablement contrôlés, afin de s'assurer que ces AHLs n'ont pas été dégradées au cours des expérimentations. Testée sur quelques fonctions biologiques de TC15, la C₁₂-HSL commerciale n'a pas montré d'effet ni sur l'adhésion, ni sur la formation de biofilm, ni sur le swarming et le twitching de la bactérie. En revanche, elle a montré un effet plutôt antagoniste sur le swimming de la bactérie. Aussi, certaines AHLs exogènes testées sur la capacité d'adhésion des bactéries ont montré un effet anti adhésion significatif sur les bactéries TC8, TC14 et 4M6 qui ne produisent pas d'AHLs intrinsèques. Il s'agit de la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL chez TC14, ainsi que de la C₁₄-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL chez 4M6, avec des CE₅₀ comprises entre 143 et 403 µM. Chez 4M6, en plus de l'effet anti adhésion significatif, la C₁₄-HSL et la 3-oxo-C₆-HSL se sont aussi révélées être inhibitrices du swimming et surtout du swarming à partir de 50 µM. Cela démontre bien le rôle écologique que peut avoir les AHLs produites par les bactéries dans l'environnement.

*Chapitre IV :
Régulation de la production de
violacéine et de phénotypes
associés au biofilm par des
AHLs exogènes chez TC14*

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, il a été observé une difficulté à faire croître sur une même gélose les bactéries marines et les biosenseurs. Partant de ce constat, il a paru intéressant de trouver parmi les bactéries marines, une bactérie qui permettra de tester le QS des autres bactéries marines sans être confronté à la contrainte du milieu de culture. C'est dans cette optique que la souche marine *P. ulvae* TC14, ayant fait objet de la première partie de cette étude s'est particulièrement distinguée pour deux raisons principales. Tout d'abord, parce qu'elle produit un pigment de couleur pourpre, comparable à la violacéine de *C. violaceum* 12472 ou *C. violaceum* CV026 en présence de la C₆-HSL. Ensuite, parce qu'elle forme un biofilm conséquent sous certaines conditions (précédemment décrites). Le QS étant très souvent impliqué dans les deux processus chez certaines bactéries, l'objectif a été de vérifier s'il pourrait exister une éventuelle implication du QS dans l'expression de l'un ou de l'autre des deux phénotypes observables de TC14, afin de parvenir à faire de cette souche un outil de test marin pour le screening de molécules inductrices ou inhibitrices du QS.

Du chapitre précédent, il est ressorti que TC14 ne produisait pas d'AHLs intrinsèques. Il s'est donc avéré intéressant de vérifier si la production de la violacéine et la formation de biofilm chez cette dernière pouvaient être sous la régulation de molécules exogènes du QS, particulièrement des AHLs exogènes. Si tel est le cas, cette souche pourrait être utilisée comme un outil pour le criblage de molécules inhibitrices du QS chez des bactéries d'origine marine comme mentionné précédemment.

Outre l'objectif du développement d'un outil de tests marin, l'étude de la production de violacéine et de la formation de biofilm de TC14 semble être intéressante pour des intérêts biothérapeutiques et antibiofilm. En effet, la violacéine est une molécule antibiotique qui a montré un effet antibactérien intéressant et plusieurs autres activités biologiques (Durán & Menck, 2001). De plus, la formation de biofilm par des microorganismes marins tels que les bactéries aboutit au biofouling qui constitue une problématique de recherche essentielle, d'un point de vue environnemental et économique.

Ce chapitre sera consacré à l'étude de l'effet des molécules AHLs exogènes sur la régulation de (i) la production de violacéine, (ii) la motilité par swimming et par swarming et (iii) la formation de biofilm de la souche marine *P. ulvae* TC14.

2. Effet des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14

Les premiers essais de la mise en place de l'outil de tests TC14 se sont orientés vers le pigment pourpre produit par la souche. Dans cette partie, différents points ont été abordés : (i) la caractérisation du pigment pourpre de TC14 en tant que violacéine, (ii) la mise en évidence de la production de violacéine dans deux milieux de culture marins différents (VNSS et MB) en conditions de culture planctonique, (iii) la régulation de la production de violacéine par des AHLs exogènes en conditions planctoniques et sessiles, dans les deux milieux de culture précités et (iv) la vérification de l'effet de la concentration des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14.

Les résultats seront présentés sous forme d'un article soumis dans la revue 'Microbiology'. Des résultats complémentaires portant sur l'effet de la concentration des AHLs exogènes sur la production de violacéine ont également été ajoutés.

2.1. Article soumis à la publication

Regulation of violacein production in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 by exogenous quorum sensing *N*-acylhomoserine lactones (AHLs)

Armande Mireille Ayé¹, Maryse Bonnin-Jusserand^{1,2}, Florence Brian-Jaisson¹, Annick Ortalo-Magné¹, Gérald Culioli¹, Rose Koffi Nevry³, Nadia Rabah¹, Maëlle Molmeret¹ and Yves Blache¹

¹Université de Toulon, MAPIEM, EA 4323, 83957 La Garde, France

²Unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), Université du Littoral Côte d'Opale, 62327 Boulogne Sur Mer, France

³Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie, Université Nangui-Abrogoua 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

Running title: *P. ulvae* TC14 violacein production is controlled by exogenous AHLs

Key words: Violacein, AHL, Quorum Sensing, *Pseudoalteromonas ulvae*, marine biofilm

Corresponding author:

Maëlle Molmeret: molmeret@univ-tln.fr

+33494146718

Abstract

Violacein is a purple pigment showing therapeutic interests such as bactericidal antiparasitic and antiviral activities. These properties make violacein-producing microorganisms interesting candidates to study in particular regarding this pigment production. Although, *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) are known to play a role in the regulation of violacein synthesis, overall little data are available, in particular regarding marine organisms.

In this study, we have identified the purple pigment of a Mediterranean Sea-isolated strain, *Pseudoalteromonas ulvae*, TC14 as violacein, its characteristics fitting the ones described in the literature. Planktonic bacteria produced more violacein in the VNSS medium in which they grew less than in the MB medium. When evaluated in biofilms, its production was more important in the sessile state than in the planktonic one, whether MB or VNSS was used. Using different approaches, the results also show that TC14 did not produce intrinsic AHLs in our conditions. However, the production of violacein was influenced by exogenous AHLs in particular for planktonic bacteria grown in VNSS and sessile ones cultured in MB. Therefore, TC14 could possess a functional QS receptor capable of sensing extrinsic AHLs. These results show that the expression of QS regulated genes such as those involved in violacein production, can be modulated by environmental factors. We have therefore identified conditions to use for planktonic or for sessile bacteria in order to obtain a substantial production of violacein in marine media. This could be useful for the screening of anti-QS molecules in conditions closer to the ones found in the seawater.

Introduction

Violacein is a purple antibiotic pigment, derived from two modified tryptophan residues and composed by three main subunits: 5-hydroxyindole, oxindole and 2-pyrrolidone (Dessaux *et al.*, 2004; Hoshino *et al.*, 1987; Yada *et al.*, 2008). This natural compound has demonstrated several therapeutic properties in particular a bactericidal activity against Gram-positive including *Mycobacterium tuberculosis* (Durán *et al.*, 1983), *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2012), while it has been described with little activity against Gram-negative bacteria (Durán & Menck, 2001). For example, no activity was observed against *Escherichia coli* or *Xanthomonas campestris* (Wang *et al.*, 2012). Violacein also exhibits an interesting anti-trypanosomal activity *in vitro* against *Trypanosoma cruzi* the causative agent of Chagas disease (Durán *et al.*, 2007), an antiparasitic activity against *Lakshmana amazonensi* (Leon *et al.*, 2001), a toxicity toward human or murine tumor cells through induction of apoptosis (Melo *et al.*, 2000), as well as antiviral activities *in vitro* against Herpes Simplex virus and poliovirus (Durán *et al.*, 2007). It shows also an antioxidant effect preventing oxidative stress induced by reactive species of lipid membranes, where it is able to scavenge nitric oxide and the superoxide radical (Konzen *et al.*, 2006). At last, it has also some anti-diarrheal and ulcer-protective effects on rats but the mechanisms have to be further investigated (Antonisamy *et al.*, 2009).

These properties made violacein-producing microorganisms interesting candidates for further studies. It could be of particular interest to understand how violacein is produced and regulated. Violacein is produced by a wide variety of microorganisms, such as *Chromobacterium violaceum*, a well-known telluric bacterium (Mendes *et*

al., 2001), *Duganella* sp. B2 (Wang *et al.*, 2009), as is *Janthinobacterium lividum*, a psychrotrophic bacterium (Lu *et al.*, 2009), and by several marine isolates of the genus *Pseudoalteromonas* such as *P. luteoviolacea*, *P. denitrificans* and *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 (Wang *et al.*, 2008; Yada *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2007). In addition of extrinsic or environmental factors such as temperature, medium composition, that can play a role in its production (Mendes *et al.*, 2001; Pantanella *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009), *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) autoinducers are key parameters of the regulation of violacein synthesis in Gram-negative bacteria such as *C. violaceum* (Durán & Menck, 2001; McClean *et al.*, 1997) or *Pseudoalteromonas* sp. (Wang *et al.*, 2008). AHLs are signaling diffusible molecules involved in bacteria cell-to-cell communication (Fuqua & Greenberg 2002), also described as quorum sensing (QS) system (Fuqua *et al.*, 1994; Whitehead *et al.*, 2001). Such a mechanism is used by bacteria to regulate their genes expression in a synchronized manner and dependent on the cell density. In Gram negative bacteria, AHLs are typically produced by an enzyme LuxI-type (AHL synthase) and passively secreted into the medium. When the extracellular concentration of AHLs reaches a critical threshold, these compounds penetrate into the cell and bind to LuxR-type receptors. The complex AHL-receptor, binds to target genes and regulates the transcription of several genes, including genes involved in bioluminescence (Schaefer *et al.*, 1996b), virulence factors synthesis (Rutherford & Bassler, 2012b), biofilm formation (Davies *et al.*, 1998), attachment, motility (Givskov *et al.*, 1998a) and pigments production (McClean *et al.*, 1997). In *C. violaceum*, for instance, violacein synthesis is under the control of a pair of genes, *cviI* and *cviR* (homologs to *luxI* and *luxR*) and the signal hexanoyl-*L*-homoserine lactone (C₆-HSL). Violacein production in a *C. violaceum* CV026 strain, whose gene *cviI* has been invalidated implying that no AHLs are produced, but is however inducible by exogenous AHLs with *N*-acyl side chains from C₄ to C₈ and inhibited by those bearing *N*-acyl side chains from C₁₀ to C₁₄. CV026 can therefore be induced by exogenous AHLs to produce violacein as previously described (McClean *et al.*, 1997). In some other *C. violaceum* strains, such as the 12472 strain, the pattern of induction and inhibition of violacein production by AHLs is different, since in this strain, the C₁₀-HSL is also able to induce the production of violacein (Morohoshi *et al.*, 2008; Morohoshi *et al.*, 2010). Overall, little data are available on the regulation of violacein production by QS molecules.

In this study, the isolation of a number of bacterial strains from biofilms formed on immersed surfaces in the Mediterranean Sea has unraveled the identification of a new strain of *Pseudoalteromonas ulvae* named TC14, which forms a biofilm on polystyrene *in vitro* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014) and produces a purple pigment similar to the violacein studied from another marine *Pseudoalteromonas* isolate (Egan *et al.*, 2001). Here, we have investigated whether *Pseudoalteromonas* TC14 produces the violacein pigment and if intrinsic AHLs or exogenous AHLs could influence its production.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Pseudoalteromonas ulvae TC14 was cultivated aerobically either on the VNSS (Väätänen Nine Salt Solution) [NaCl (17.6 g l⁻¹), Na₂SO₄ (1.47 g l⁻¹), NaHCO₃ (0.008 g l⁻¹), KCl (0.25 g l⁻¹) KBr (0.04 g l⁻¹), MgCl₂ 6 H₂O (1.87 g l⁻¹), CaCl₂ (0.31 g l⁻¹), SrCl₂ (0.01 g l⁻¹), H₃BO₃ (0.01 g l⁻¹), peptone (1 g l⁻¹), yeast extract (0.5 g l⁻¹), glucose (0.5 g l⁻¹), starch (0.5 g l⁻¹), FeSO₄ 7H₂O (0.01 g l⁻¹), Na₂HPO₄ (0.01 g l⁻¹)] (Mardén *et al.*, 1985a) or the MB medium (Marine Broth) (Difco) [peptone (5 g l⁻¹), yeast extract (1 g l⁻¹), NaCl (19.45 g l⁻¹), Na₂SO₄ (3.24 g

I^{-1}), Na_2CO_3 (0.16 g l^{-1}), KCl (0.55 g l^{-1}), KBr (0.08 g l^{-1}), MgCl_2 (5.9 g l^{-1}), CaCl_2 (1.8 g l^{-1}), SrCl_2 (0.034 g l^{-1}), H_3BO_3 (0.022 g l^{-1}), $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ (0.10 g l^{-1}), NaF (0.0024 g l^{-1}), $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ (0.0016 g l^{-1}), Na_2HPO_4 (0.0080 g l^{-1}), Na_2SiO_3 (0.0040 g l^{-1}) (Høvik Hansen & Sørheim, 1991), two marine media frequently used for marine bacteria (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Egan *et al.*, 2001) at 20°C with agitation at 120 rpm (except for the production of biofilm). Biosensors used in this study are listed in the table 1. Their strains were cultivated in LB (Luria Bertani) broth at 30°C with agitation at 200 rpm, supplemented with antibiotics when necessary.

Planktonic culture conditions

P. ulvae TC14 was cultivated in either VNSS or MB broth from a post-exponentially grown bacteria suspension in a 250 ml Erlenmeyer flask with the addition of AHLs at a final concentration of 50 μM when needed, similar to previous studies (Geske *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). A stock solution of each AHL has been prepared at 5 mM in VNSS or LB with 10% DMSO and stored at -20°C, in order to get a final AHL concentration of 50 μM , with only 0.05% DMSO for the bioassays. The bacterial growth was monitored by measuring the absorbance at 700 nm every 24 h.

Sessile culture conditions

Plastic Petri dishes were inoculated with 10 ml of post-exponentially grown bacteria at $\text{OD}_{700\text{nm}} = 0.1$ either in the VNSS or MB broth. AHLs were added at 50 μM (prepared as above). The incubation was performed at 20°C for 72 h in order to allow biofilm development. After 48 h of incubation, 10 ml of broth supplemented or not with AHLs were added. The supernatant was removed and all the biofilm was scrapped in the PBS medium.

Extraction and dosage of violacein

Following cultures of bacteria in planktonic or sessile conditions, extraction of violacein at different time points was performed following the protocol described by Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2008) and Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2009). One ml of TC14 culture was centrifuged at 6,000 g for 10 min and the supernatant was discarded. The cell pellet was mixed with 1 ml of absolute ethanol (Fischer). The resulting mixture was submitted to ultrasonication until the bacterial cells were completely bleached (after about 20 min). The ethanol extract was separated from the cells by centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min and the absorbance of the violet pigment was monitored at 575 nm using a spectrophotometer (Thermo Scientific, Genesys 20).

Characterization of violacein by LC/DAD/MS

The presence of violacein in crude ethanol extracts of *P. ulvae* was monitored by LC/DAD/MS. Chromatographic analyses were performed on a LaChrom Elite chromatographic system equipped with a DAD detector (L-2455; 190 to 700 nm) and an Esquire 6000 ESI-MS spectrometer. Compounds separation was achieved on an analytical reversed-phase column (Phenomenex, Gemini C₆-Phenyl, 4 μm , 250 \times 3 mm; flow rate: 0.5 ml min^{-1}) maintained at 30°C. Bacterial extracts were solubilized in 2 mL of MeOH (HPLC grade) and a 20 μl sample volume was injected into the chromatographic system. The gradient elution was implemented with a binary mobile phase consisting of solvent A [water/formic acid (100:0.1, v/v)] and solvent B [MeCN/formic acid (100:0.1, v/v)]. The gradient program started with 90% of A during 5 min, then the

proportion of B increased linearly from 10 to 100% in 30 min and this eluent composition was maintained for 20 min until re-equilibration of the system to the initial conditions (10 min).

Extraction of AHLs

AHLs extraction was performed according to the protocol described by Morin *et al.* (Morin *et al.*, 2003) and Gardères *et al.* (Gardères *et al.*, 2012). At different time points of the TC14 growth (6, 12, 24, 48, 72 and 96 h), 50 ml of culture were centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4°C. Culture supernatants were extracted three times with 50 ml of dichloromethane (VWR). The organic phase was dried with the addition of anhydrous magnesium sulfate (OSI), then filtered and evaporated under reduced pressure at 40°C. The dry extract obtained was dissolved in 1 ml of methanol (VWR, HPLC-grade) to perform LC/MS analysis and in 10% DMSO as a stock solution for all phenotypical experiments, and then stored at -80°C until use. The organic extracts of the biosensors *A. tumefaciens* KYC6 and *C. violaceum* 31532 have been obtained using the same protocol.

Microplate assays

Twenty-four-well microplates were inoculated with 100 µl of stock solution of extracts of the biosensors *A. tumefaciens* KYC6 and *C. violaceum* 31532 and 900 µl of TC14 suspension prepared at OD_{700nm} of 0.1 in VNSS. The incubation was performed at 20°C under similar agitation conditions and the growth was monitored by measuring the OD_{700nm} every 24 h during 3 days, while violacein was measured at OD_{575nm}.

Biosensor assays

P. ulvae TC14 and the biosensors *C. violaceum* CV026 or *A. tumefaciens* A136 were streaked, 0.5 cm apart from each other (“T streak” shape) on a VNSS agar plate. The medium was supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) (VWR) when A136 was plated due to the presence of the *lacZ* reporter system. Both types of assays (with CV026 or A136) were incubated at 20°C for 48 h, the growth temperature of the marine strains.

A second approach was to grow each strain in their respective medium and conditions of growth, except that TC14 was streaked on a smaller Petri dish (50 mm of diameter). After 24h of incubation, the smaller Petri dish was turned upside down onto the bigger ones, in order to allow proximity between TC14 and biosensors (Huang *et al.*, 2009). This combination of dishes was then incubated at 20°C for an optimal production of potential AHLs by the marine strain.

At last the inoculation of 10 µl of TC14 bacterial extract was performed in the center of LB agar Petri dishes. After evaporation of the solvent, biosensors CV026 or A136 were streaked near the deposit, and the plates were incubated at 30°C for 48h the temperature convenient for biosensors.

LC/MS analysis of AHLs

Solutions of AHLs standards were prepared by solubilization of commercial compounds [*N*-butyryl-*L*-homoserine lactone (C₄-HSL), *N*-hexanoyl-*L*-homoserine lactone (C₆-HSL) (Cayman Chemical), *N*-heptanoyl-*L*-homoserine lactone (C₇-HSL), *N*-octanoyl-*L*-homoserine lactone (C₈-HSL), *N*-decanoyl-*L*-homoserine lactone

(C₁₀-HSL), *N*-dodecanoyl-*L*-homoserine lactone (C₁₂-HSL), *N*-tetradecanoyl-*L*-homoserine lactone (C₁₄-HSL), *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C₆-HSL), *N*-(3-oxooctanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C₈-HSL) and *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Sigma Aldrich)] in methanol (VWR, HPLC grade) at a concentration of 1 mg ml⁻¹. The resulting solutions were stored at -80°C until use.

AHLs were detected with the HPLC system previously described for the characterization of violacein. Separations were performed using a reversed-phase analytical column (Merck Purospher STAR RP18, 5 µm, 125 × 4 mm; flow rate: 0.5 ml min⁻¹) and a binary mobile phase [A: water/formic acid (100:1, v/v) and B: acetonitrile/formic acid (100:1, v/v)]. The elution program was performed as follow: (i) an initial isocratic step with 10% of B for 16 min, (ii) a linear gradient leading to 100% of B for 30 min, and (iii) a final re-equilibration of the chromatographic system with 10% of B for 10 min. Thus, 25 µL of each AHL standard and TC14 extracts were injected. AHLs were detected on the extracted ion chromatogram (EIC) by monitoring the characteristic fragment ion at *m/z* 102 derived from the homoserine lactone moiety.

Statistical analyses

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses of the results regarding the violacein production in the planktonic and sessile conditions. Data were analyzed using one-way and two-way ANOVA and treatment effects were separated using Bonferroni and Tukey's multiple comparison post hoc tests. Statistical significance was accepted from *p* < 0.05.

Results

Characterization of *P. ulvae* TC14 purple pigment as violacein

P. ulvae was previously shown to produce a purple pigment (Egan *et al.*, 2001). In this study, ethanolic pigment extract of the *P. ulvae* TC14 strain were analyzed by LC/DAD/MS and the presence of violacein was confirmed regarding its experimental MS and UV-Vis data. The chemical profiles obtained from bacterial samples revealed a peak at *t_R* = 22.8 min, which showed: (i) an (+)ESI-MS spectrum (Fig. S1) with a pseudo-molecular ion peak at *m/z* 344 [M+H]⁺ and fragment peaks at *m/z* 326 [M-H₂O+H]⁺ and *m/z* 316 [M-CO+H]⁺ in agreement with the molecular formula of violacein (C₂₀H₁₃O₃N₃, *m/z* 343), (ii) an (-)ESI-MS spectrum (Fig. S2) with a pseudo-molecular ion peak at *m/z* 342 [M-H]⁻ together with peaks of fragment ions at *m/z* 324 [M-H₂O-H]⁺, 298, 209, and 157 (as described by Yada *et al.* (2008) (Yada *et al.*, 2008) and Ahmad *et al.* 2012 (Ahmad *et al.*, 2012) for violacein), and (iii) an UV-Vis spectrum (Fig. S3) with maximal absorptions at 258, 375, and 575 nm (MeOH), in accordance with previously published data for violacein (Rettori & Durán, 1998). It may be noted that, in the chromatographic window defined by our experimental conditions, this compound (i.e. the peak at *t_R* = 22.8 min) is the only one which showed a significant absorption at 575 nm. This fact allowed us to use this specific wavelength in order to monitor violacein production in *P. ulvae* TC14 samples.

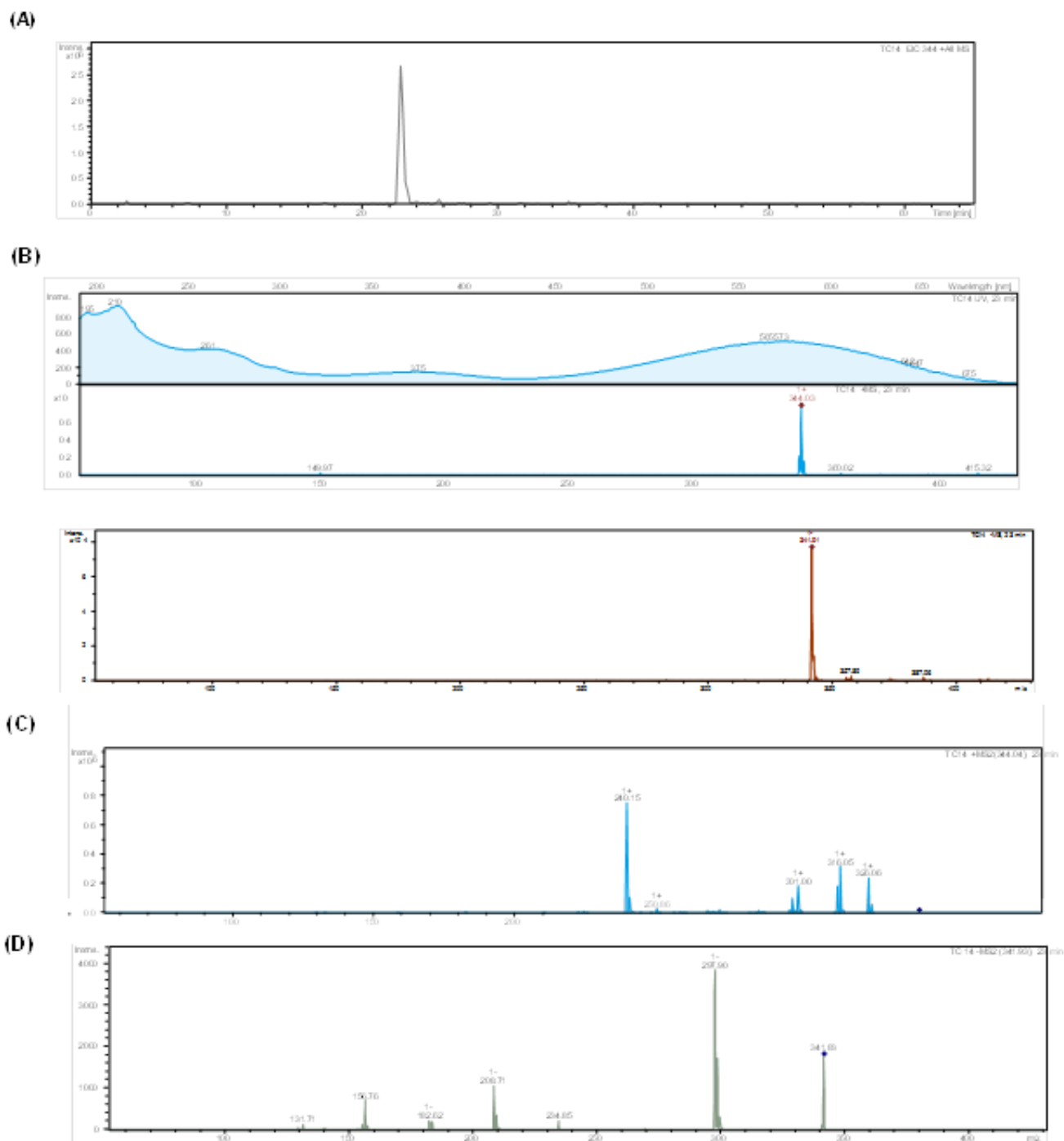


Fig. S1. LC-DAD/MS analysis of an ethanolic extract of TC14:

(A) +MS (EIC 344) chromatogram which showed a main peak at $t_R = 23$ min, (B) UV-Vis, (+)-ESI-MS and (-)-ESI-MS spectra of compound at $t_R = 23$ min, (C) +MS² fragmentation of the ion at m/z 344 and (D) -MS² fragmentation of the ion at m/z 342.

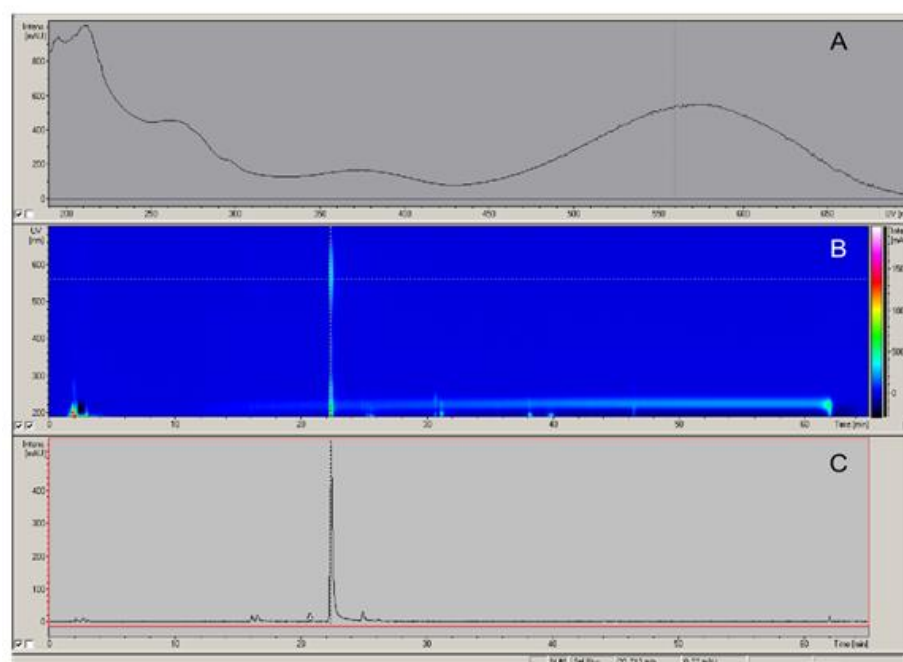


Fig. S2. HPLC-DAD data of an ethanolic extract of *P. ulvae* TC14.

(A) UV-Vis. spectrum of compound at $t_R = 23$ min., (B) 3D chromatogram display, and (C) UV-Vis. chromatogram at 575 nm.

Growth and violacein production by *P. ulvae* TC14 in VNSS versus MB

In order to select the media in which *P. ulvae* TC14 grows and produce a high amount of violacein, the production of violacein by *P. ulvae* TC14 was studied in marine rich media either in the VNSS or the MB medium (Fig. 1). The violet pigment was extracted from the bacterial cells during the growth and its absorbance was measured at 575 nm. Simultaneously, the growth of TC14 was monitored at 700 nm. As shown in Figure 1, *P. ulvae* TC14 grew twice more in MB than in VNSS. In VNSS, the growth decreased slowly after 24h of incubation, which corresponds to the post-exponential phase. While in MB, the bacteria grew up exponentially until about 24h before slowing down to 72 h and declining afterward. However, regarding the production of violacein, TC14 did not significantly biosynthesize the pigment in MB (OD_{575nm} max = 0.02), whereas the production was 6 fold higher in VNSS, progressing along with the bacterial growth and reaching a maximum value (OD_{575nm} max = 0.12) after 96h of incubation. Taken together, these results show that TC14 is able to grow well in MB, while producing a very low amount of violacein in the medium. However, this strain grows in a lesser extent (about twice less) in VNSS, but with a substantial production (6 fold difference at 96h) of violacein. The modulation of a QS-dependent expression of phenotypes according to the culture conditions has been already observed and is not always linked to a difference in the cell number (Lazazzera, 2000b; Makemson *et al.*, 1997a; Srivastava & Waters, 2012; Wagner *et al.*, 2003). Therefore, the VNSS medium appears to be the most appropriate media to study the regulation of violacein production by potential intrinsic or extrinsic AHLs.

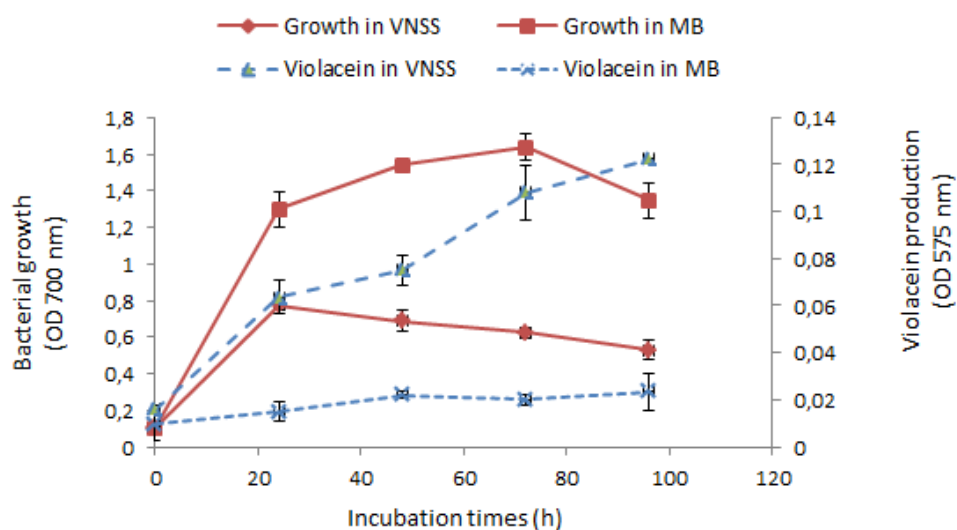


Fig. 1 Kinetics of TC14 growth and violacein production in MB and VNSS after different incubation times (0, 24, 48, 72 and 96h). Absorbance was monitored at 700 nm for the growth and at 575 nm for violacein production. Each experiment was performed three times in triplicates

Evaluation of AHLs production by *P. ulvae* TC14

Two biosensors *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* A136 were used in this study where CV026 responds to C₆-HSL and C₄-HSL and A136 to C₆-HSL, C₈-HSL, C₁₀-HSL, C₁₂-HSL, C₁₄-HSL, 3-oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL and to all 3-oxo-HSL, 3-OH- C₆-HSL, 3-OH-C₈-HSL and 3-OH-C₁₀-HSL. The reporter systems were the violacein production for CV026 and the β -galactosidase for A136 carrying 2 plasmids (pCF218 and pCF327) (Steindler & Venturi, 2007). Neither the blue color due to hydrolysis of X-gal in the case of A136 nor the purple color due to synthesis of violacein for CV026 was detected. In contrast, the control strain *A. tumefaciens* KYC6 triggered the QS response of A136, leading to the hydrolysis of the chromogenous X-gal substrate by the produced β -galactosidase enzyme into a blue molecule in one hand, and the *C. violaceum* 31532 strain synthesizing the C₆-HSL allowed the production of violacein by the biosensor CV026 on the other hand (Fig. S4a). Similarly, using the second approach with the upside down dishes, no change in colonies colors were observed in contrast with the controls (Fig. S4b). These results indicate that none of the homologous AHLs listed above were able to induce a response of the biosensors in these conditions. To rule out the potential issue of the culture conditions compatibility between the strains, extracts obtained from TC14 cultures were tested on the biosensors grown on their dedicated LB medium. No modification of the colonies color was observed (Fig. S4c) while for the positive controls, the extract of *A. tumefaciens* KYC6 triggered the production of blue colonies of the A136 strain, and the extract of *C. violaceum* 31532 induced the production of violacein by the CV026 strain. Therefore, these biosensors assays indicated that in our conditions, TC14 did not produce AHLs in the range recognized by these two biosensors.

In order to check if the bacteria were able to produce other AHL molecules that are outside the range recognized by the biosensors used, extracts of TC14 harvested at different growth phases in VNSS, in particular in exponential and stationary phases, were injected and analyzed by LC-MS. These different extracts exhibited comparable chromatograms (Fig. S5). No obvious AHL signal was detected and, in particular, no characteristic ion peak at m/z 102 (corresponding to the lactone moiety) was observed in the EIC. However, a signal corresponding to the C₆-HSL was detected (data not shown) in the extracts of *C. violaceum* 31532 (positive control of *C. violaceum* CV026). In addition, we did not observe any modification of the pH values in VNSS during the growth of TC14, which could have altered the integrity of the AHLs. Taken together, these results suggest that TC14 does not produce intrinsic AHL molecules in these conditions.

Impact of exogenous AHLs on the regulation of violacein production in planktonic conditions in VNSS *versus* MB

In order to investigate if the production of violacein is controlled by a QS system with a functional LuxR-type receptor, the effects of some current exogenous AHLs were first evaluated in planktonic conditions, either in the VNSS or the MB medium. AHL with an acyl chain length from 4 to 14 carbons, as well as 3-oxo-AHL derivatives were added at 50 μ M in TC14 cultures. The ones which had an effect on violacein production in VNSS were then used in the other experiments. The violacein was extracted and quantified by spectrophotometry at 575 nm at the following time points 0, 24, 48 and 72 h.

After 24 h of incubation in VNSS, no difference in the production of violacein was observed between the control without AHLs and the cultures where they were added, except in the case of the 3-oxo-C₈-HSL ($p < 0.05$). At 48 h of incubation, significant differences were observed, for the 3-oxo-C₈- ($p < 0.05$) and C₆-HSLs ($p < 0.01$). The addition of the C₆-, 3-oxo-C₈- and 3-oxo-C₁₂-HSLs increased more significantly the production of violacein at 72 h ($p < 0.001$) than the addition of the C₁₂-HSL ($p < 0.05$), compared to the control without AHLs. In contrast, the 3-oxo-C₆-HSL decreased significantly the production of violacein at 72 h ($p < 0.01$) (Fig. 2a). Most of the effects of exogenous AHLs were observed during the post-stationary growth phase i.e. after 24 h of growth. The same pattern of results was obtained when the culture of TC14 was incubated in presence of organic extracts of the biosensors *A. tumefaciens* KYC6 strain and *C. violaceum* 31532 strains, which overproduced the 3-oxo-C₈- and the C₆-HSLs, respectively. These extracts increased the production of violacein in TC14. Significant differences were observed for the extract of the KYC6 strain at 48 and 72 h of incubation ($p < 0.001$) and the extract of the 31532 strain at 72 h ($p < 0.05$) (Fig. 3).

The presence of the C₆-, C₁₂-, 3-oxo-C₈-, 3-oxo-C₁₂- as well as 3-oxo-C₆-HSLs was evaluated on the production of violacein by TC14 in MB. No difference was observed compared to the control, where no AHL was added (Fig. 2b). Little or no violacein was produced in all the cases studied, as shown by the absorbance values obtained ($OD_{575nm} < 0.1$), which were not significantly different.

At last, the growth of TC14 was also monitored during 72 h (Fig. S6) in the VNSS medium supplemented with AHLs at 50 μ M to ensure that these compounds showed no effect on this parameter. None of the AHLs modified TC14 growth compared to the control sample without added AHLs, suggesting that they do not present any toxicity on this strain in these conditions. Taken together, these results indicate that production of violacein in TC14 is influenced by exogenous AHLs when the culture is performed in VNSS, but not in MB.

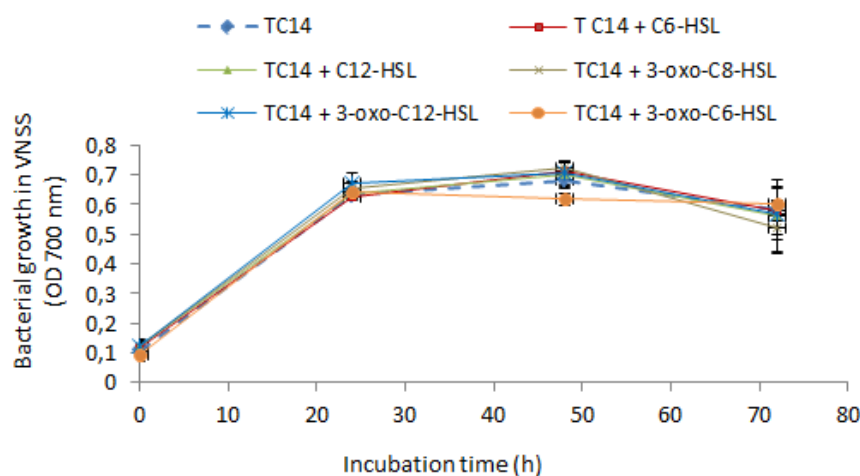


Fig. S3. TC14 growth in VNSS supplemented with exogenous AHLs at 50 μ M. Bacterial growth was monitored by measuring the absorbance at 700 nm at different incubation times. Experiments were made in triplicate with three independent culture batches.

Impact of exogenous AHLs on the regulation of violacein production in sessile conditions in VNSS *versus* MB

The study of the influence of AHLs on the ability for TC14 to produce violacein was also performed in biofilm formed in both media in polystyrene Petri dishes after 72 h of culture and the results were compared to those obtained with the planktonic cultures at the same time (72 h). The presence of 3-oxo-C₈-HSL induced a significant increase in the violacein production ($p < 0.01$) in TC14 biofilm formed in MB (Fig. 2d), while the other AHLs had no effect. When the biofilm of TC14 was grown in VNSS, the presence of AHLs did not induce any modification in the violacein production by this strain (Fig. 2c).

Impact of exogenous AHLs on the regulation of violacein production in VNSS and in MB, in sessile versus planktonic conditions

When the violacein production of TC14 was compared in the sessile versus planktonic conditions, as compared to the sample without AHL, its presence was overall more important in sessile conditions than in planktonic ones, whether MB or VNSS was used (Fig. 2e and 2f).

At last, we compared the amount of violacein produced within the biofilm and in association with un-attached bacteria present in the supernatant (Fig. 4a and 4b). As shown in Figure 4, in both VNSS and MB media, the violacein was mainly detected in bacteria present in the biofilm (90%) and not in the supernatant, while the bacterial concentration was higher in the supernatant (data not shown). Therefore, most of the violacein was not associated with the unattached bacteria in the supernatant but was kept within the biofilm.

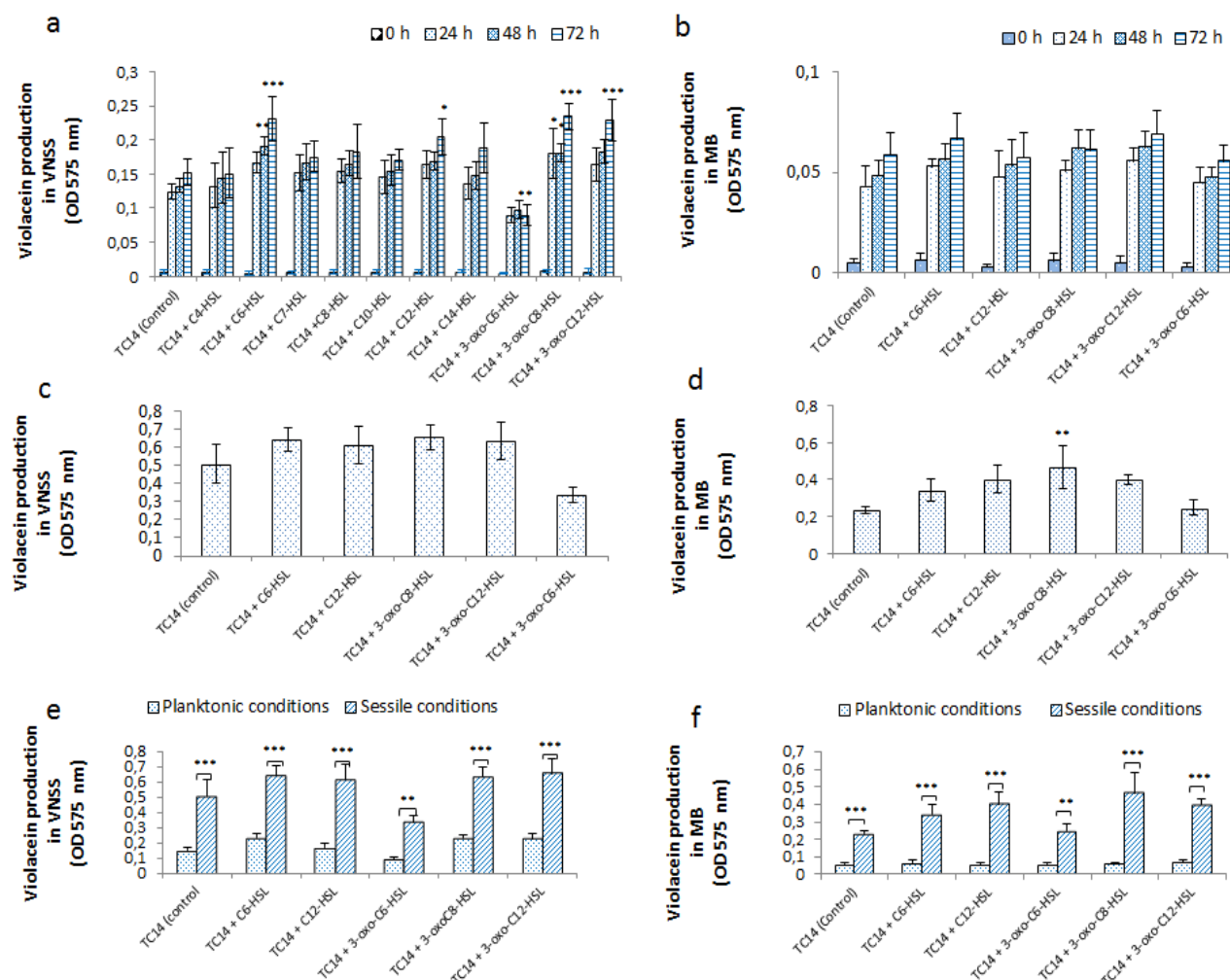


Fig. 2 Effect of exogenous AHLs tested at 50 μ M on production of violacein from TC14 in different media and culture conditions: **(a)** in VNSS and planktonic conditions, **(b)** in MB and planktonic conditions, **(c)** in VNSS and sessile conditions, **(d)** in MB and sessile conditions. **(e)** and **(f)** represent a comparison of the production of violacein in planktonic conditions at 72h and sessile conditions respectively in VNSS (a and c) and MB (b and d). Experiments highlighted by asterisks were significantly different compared to the control (TC14 cultures without AHLs). (Bonferroni; ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$) at the indicated time. Each experiment was performed three times in triplicates.

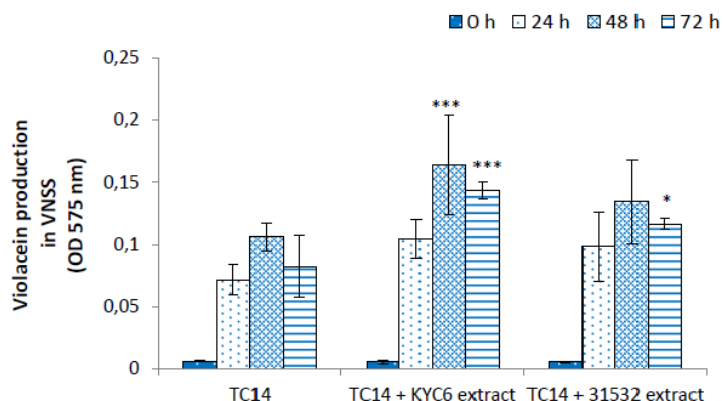


Fig. 3 Effect of extracts of *A. tumefaciens* KYC6 and *C. violaceum* 31532 (positive controls) on the production of violacein by TC14 in VNSS. Violacein was measured at different incubation times (0, 24, 48 and 72h) and results were compared to the control (TC14 cultures without extracts). Conditions highlighted by asterisks were significantly different compared to the control (Bonferroni; ***: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$). Each experiment was performed three times in triplicates.

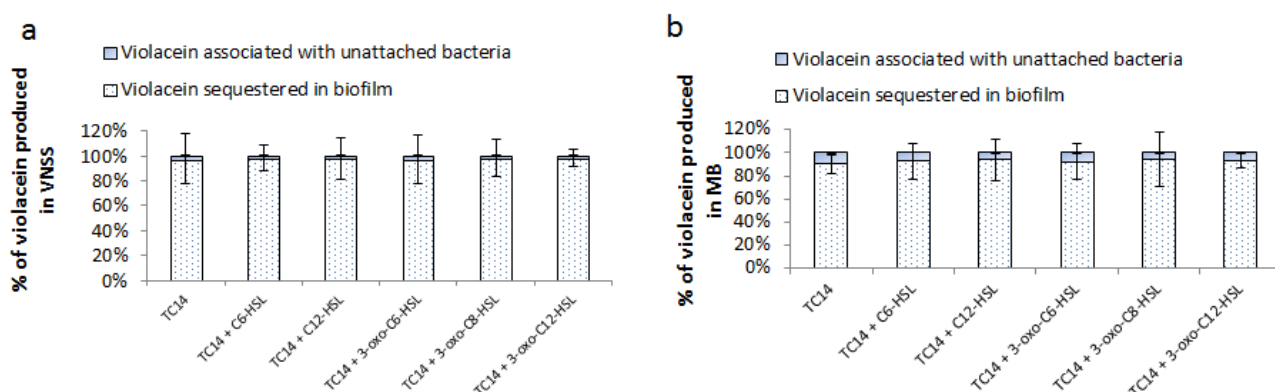


Fig. 4 Comparison of the relative (%) quantity of violacein sequestered in biofilm compared to the one associated with un-attached planktonic bacteria in presence or in absence of exogenous AHLs: (a) in VNSS and (b) in MB. Each experiment was performed three times in triplicates

Discussion

In this study, the marine bacterium *P. ulvae* TC14 isolated in the Mediterranean Sea, one of the rare bacterial producers of purple pigments has been investigated for its pigment production and its potential relationship with QS. This pigment has been characterized similarly to previous published data (Durán *et al.*, 2007; Yada *et al.*, 2008) as violacein. The synthesis of this pigment has been evaluated in presence of several AHLs molecules, in different media, growth phases and culture conditions.

Bacterial growth and production of violacein have been compared in two rich marine broths, the VNSS and MB media. The results show that TC14 produced violacein in VNSS but not significantly in MB, while this strain grew twice more in MB than in VNSS. Results from Egan *et al.* show that two marine strains *P. ulvae* UL12T and UL13 produced a purple pigment in VNSS but not in the LB20 and TSB media (Egan *et al.*, 2001), suggesting that the difference in violacein production could be linked to the composition of the culture medium.

According to some authors, violacein production depends on carbon sources and/or metabolic stress (Antônio & Creczynski-Pasa, 2004; Mendes *et al.*, 2001; Pantanella *et al.*, 2007). Violacein production can be induced in the presence of glycerol and antibiotics but reduced in the presence of glucose (**Pantanella *et al.*, 2007**). Similarly, violacein synthesis, especially in *C. violaceum* is enhanced by nutrient factors including carbon or nitrogen sources such as glucose, peptone and yeast extract and, peptone was shown to have the largest effect on bacteria cellular mass and on violacein production (**Mendes *et al.*, 2001**). In our study, the main difference between these two marine media, beside salts composition, is related to the carbon sources. MB has 5 times more peptone and twice more yeast extract and no glucose or soluble starch compared to VNSS. Thus, the absence of glucose and starch might not prevent bacterial growth but might indirectly reduce the amount of produced violacein in MB. Beside the composition of the culture medium, the stress conditions encountered by the strain could explain the high production of violacein. Pantanella *et al.* have suggested that violacein could be synthesized in response to stress conditions resulting from a prolonged survival state (**Pantanella *et al.*, 2007**). The production of violacein by TC14 showed the largest increase in the stationary phase of growth in VNSS and reached its maximum during the early declining phase, when nutrient depletion is more pronounced. Therefore, a metabolic stress or the presence of a particular component in a higher/lower amount may have induced a modification of the production of violacein in TC14. Unraveling the effect of stress and components concentration during bacterial growth implying a minutely detailed study of the effect of each source of stress and of nutriment would probably give more information on their impact on violacein production.

In order to verify if TC14 synthesizes intrinsic AHLs, two biosensors that are able to sense a wide panel of AHLs were used (Steindler & Venturi, 2007). The results show that the use of biosensors did not allow the detection of AHLs in TC14 or in its extract. However, the use of biosensors does not allow the screening of all the AHLs. The A136 strain recognizes rather the 3-oxo-AHLs with a long acyl chain from 4 to 12 carbons, while the CV026 strain, which detects short and medium acyl chain AHLs and cannot detect the 3-hydroxy derivatives (Steindler & Venturi, 2007). The detection of other structures of AHLs especially the 3-hydroxy-AHLs and the uncommon AHLs (Steindler & Venturi, 2007) could not be tested using this approach. Therefore, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was performed, allowing the detection of all types of AHLs in bacterial extract. The LC-MS results indicate that none of the main AHL synthesized by many bacteria (Miller & Bassler, 2001) was produced during the growth of TC14 in these conditions. The range of the detection of TC14 molecules that can be detected by LC-MS has been evaluated on the basis of the known natural AHLs described from the literature (C₄-C₁₈-HSL). However the range of AHLs detection could be further investigated for other QS molecules encountered up to now in Gram negative bacteria such as quilonones (Pesci *et al.*, 1999b), AI-2 (furanosyl borate diester) (**Bassler, 2002**), indole (**Lee *et al.*, 2007**) and certain cyclic dipeptides (2,5-diketopiperazines, DKPs) (Campbell *et al.*, 2009; Holden *et al.*, 1999). In fact, a set of DKPs isolated from range of Gram negative bacteria have been reported to modulate QS receptor activity in strains previously considered as specific for AHLs. Therefore, these data suggest that the production of violacein from TC14 is not under the control of classical intrinsic AHLs in contrast with *C. violaceum*, in which biosynthesis of violacein is controlled by C₆-HSL (**Chernin *et al.*, 1998**) and *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 in which production of violacein is regulated by 3-oxo-C₈-HSL (**Wang *et al.*, 2008**). As the mechanism of production of violacein in TC14 is still unknown, the hypothesis that the physiological state of the bacterium could be involved in his production of

violacein is to be considered. Another hypothesis is that the TC14 lacks the AHL synthase gene or a functional LuxI protein while it may still possess a functional LuxR-type receptor. Indeed, some bacteria do not possess a LuxI type protein but possess a LuxR type receptor, which responds to exogenous AHLs (Case *et al.*, 2008; Dobretsov *et al.*, 2009) and regulate for instance the virulence in *Salmonella typhimurium* (Ahmer *et al.*, 1998; Smith & Ahmer, 2003), the biofilm formation in *Porphyromonas gingivalis* and *E. coli* (Asahi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007; Smith & Ahmer, 2003) and inhibit the growth in *Porphyromonas gingivalis* (Komiya-Ito *et al.*, 2006).

In order to check if the production of violacein in TC14 is under the control of QS and that TC14 is able to sense AHLs through a LuxR type protein, the production of violacein was assessed in presence of several commercial exogenous AHLs. Some these AHLs showed an agonist effect on the production of violacein of TC14 while others had an antagonist effect. The 3-oxo-C₈-, 3-oxo-C₁₂- and C₆-HSLs showed the highest increase in the production of violacein from planktonic bacteria in particular after 72h of incubation in VNSS but this phenomenon was not observed in MB. However, as in the case of *C. violaceum*, in which the C₁₀-HSL inhibits the production of violacein (Morohoshi *et al.*, 2010), the 3-oxo-C₆-HSL reduces it in TC14. It is interesting to note that the AHLs, which induce production of violacein in *C. violaceum* (C₆-HSL) and in *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 (3-oxo-C₈-HSL) (Wang *et al.*, 2008), agonized the production of violacein in TC14. Therefore, if the regulation of the production of violacein in TC14 is controlled by a functional QS system through exogenous AHLs, TC14 could be used as a tool for the screening of potential anti-QS molecules like are *C. violaceum* ATCC 12472 (McLean *et al.*, 2004) or *C. violaceum* CV017 (Dobretsov *et al.*, 2011). With such a bacterium producing a visible phenotype regulated by quorum sensing as for *C. violaceum*, not only the addition of an engineered reporter system is not needed but molecules testing can be performed in salts solutions or marine media i.e. in conditions closed to the seawater. Overall, our data show that TC14 most probably contains a functional QS receptor system which allows the sensing of exogenous AHLs. However, these data suggest that the AHLs synthases are absent or not functional in TC14, since no AHLs could be detected. One way to verify this hypothesis would be to look for the presence of *luxI* and *luxR* type genes in the genome of TC14, or better the presence and the regulation of their transcripts and proteins potential production.

In sessile conditions, TC14 exhibits the ability to produce violacein in both VNSS and MB unlike in planktonic conditions wherein violacein was mainly produced in VNSS. In biofilm, the bacterial metabolism could change, due to several factors such as the closed proximity of other bacteria, the matrix composition and structure and thus the access to nutrient/components such as oxygen (Anwar *et al.*, 1992). Several studies have reported major changes in the physiology of bacteria when grown in biofilm, such as the production of enzymes as the ones responsible for bacterial resistance toward some β -lactam antibiotics (Giwercman *et al.*, 1991) or components of biofilms as alginate (Davies *et al.*, 1993) or polysaccharides (Sutherland, 2001). Thus, the higher production of violacein by TC14 in MB in sessile versus planktonic conditions could be induced by an increase in the bacterial intrinsic stress due to modifications of their environment, regardless of the culture media and of the presence of AHLs. In presence of exogenous AHLs such as 3-oxo-C₈-HSL, the production of violacein is enhanced in MB within biofilm cultures, confirming a QS regulation. In VNSS and in sessile conditions, the exogenous AHLs tested have no effect on the violacein production. Some AHLs such as 3-oxo-C₆-HSL, which reduced the violacein in planktonic conditions, have no effect when TC14 is cultivated in sessile conditions. This could be

explained by their ability of diffusion toward the bacteria or because some external factors trigger a down-regulation of the QS system. It is known that the bacterial environment (*i.e.* culture conditions) has an important effect on the expression and the detection of QS-regulated genes, these genes being either up-regulated or down-regulated (Makemson *et al.*, 1997a; Wagner *et al.*, 2003). In some cases, starvation can even regulate the production of signaling peptides that can induce a QS response at a lower cell density (Lazazzera, 2000b). Indeed, QS is connected to other regulatory networks such as the Cyclic Di-GMP signaling system, with the overall goal of allowing bacteria to adapt and respond to changing environmental conditions, at low or high cell density (Srivastava 2012).

In conclusion, this study shows that a marine bacterium isolated from the Mediterranean Sea *P. ulvae* TC14 (Brian-Jaisson *et al.*, 2014) produces a purple pigment which was identified and characterized as violacein. Violacein, which is substantially retained in bacteria, could play an ecological role against other competitors present in their local environment such as biofilm, in particular predators that would feed on bacteria. Indeed Matz *et al.* showed that the uptake of less than three cells of violacein-producing bacteria in nanoflagellates bacterivorous protozoa resulted in rapid flagellate bacterivorous cell death after about 20 min (Durán *et al.*, 2012; Matz *et al.*, 2004). This study shows that the production of violacein by TC14 appears to be under the control of a functional QS system via exogenous AHLs suggesting the presence of a LuxR-type receptor in this strain. It also seems to be dependent on culture medium and bacteria physiological state with a higher amount of violacein being produced in planktonic conditions with VNSS and in sessile conditions with both media. This raises the possibility of using the marine bacterium *P. ulvae* TC14 as a new biosensor tool for the screening of anti-QS compounds dedicated to applications in marine environment in planktonic or sessile conditions.

Acknowledgments

This work was supported by the Université de Toulon Research BQR funding and Campus France. A. M. Ayé is recipient Campus France. We wish to thank the Pr B. McLean (Texas States University) for sending us the biosensors strains.

References

- Ahmad, W. A., Yusof, N. Z., Nordin, N., Zakaria, Z. A. & Rezali, M. F. (2012). Production and characterization of violacein by locally isolated *Chromobacterium violaceum* grown in agricultural wastes. *Appl Biochemi Biotechnol* **167**, 1220-1234.
- Ahmer, B. M. M., van Reeuwijk, J., Timmers, C. D., Valentine, P. J. & Heffron, F. (1998). *Salmonella typhimurium* Encodes an SdiA Homolog, a Putative Quorum Sensor of the LuxR Family, That Regulates Genes on the Virulence Plasmid. *Journal of Bacteriology* **180**, 1185-1193.
- Antônio, R. V. & Creczynski-Pasa, T. B. (2004). Genetic analysis of violacein biosynthesis of *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res* **3**, 85-91.
- Antonisamy, P., Kannan, P. & Ignacimuthu, S. (2009). Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* in Wistar rats. *Fund Clin Pharmacol* **23**, 483-490.
- Anwar, H., Strap, J. L. & Costerton, J. W. (1992). Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1347-1351.

- Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Asai, H., Suga, H. & Ebisu, S. (2010).** Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodont Res* **45**, 255-261.
- Bassler, B. L. (2002).** Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-424.
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y. & Molmeret, M. (2014).** Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microb Ecol*, 1-17.
- Campbell, J., Lin, Q., Geske, G. D. & Blackwell, H. E. (2009).** New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem Biol* **4**, 1051-1059.
- Case, R. J., Labbate, M. & Kjelleberg, S. (2008).** AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria *ISME Journal* **2**, 345-349.
- Chernin, L. S., Winson, M. K., Thompson, J. M., Haran, S., Bycroft, B. W., Chet, I., Williams, P. & Stewart, G. S. A. B. (1998).** Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *J Bacteriol* **180**, 4435-4441.
- Davies, D. G., Chakrabarty, A. M. & Geesey, G. G. (1993).** Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1181-1186.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- Dessaux, Y., Elmerich, C. & Faure, D. (2004).** Violacein: a molecule of biological interest originating from the soil-borne bacterium *Chromobacterium violaceum*. *Rev Med Interne* **25**, 659-662.
- Dobretsov, S., Teplitski, M. & Paul, V. (2009).** Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* **25**, 413-427.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P. & Paul, V. J. (2011).** Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**, 893-905.
- Durán, M., Ponezi, A., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M. F. S., Justo, G. Z. & Durán, N. (2012).** Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Med Chem Res* **21**, 1524-1532.
- Durán, N., Ezaro, S. & Campos, V. (1983).** Bacterial chemistry II. Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An Acad Bras Cienc* **55**, 231-234.
- Durán, N. & Menck, C. F. M. (2001).** *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit Rev Microbiol* **27**, 201-222.
- Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L. & Martins, D. (2007).** Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol Appl Biochem* **48**, 127-133.
- Egan, S., Holmström, C. & Kjelleberg, S. (2001).** *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1499-1504.
- Fuqua, C. & Winans, S. C. (1996).** Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol* **178**, 435-440.
- Fuqua, C. & Greenberg, E. P. (2002).** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Mol cell Biol* **3**, 685-695.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.

- Gardères, J., Taupin, L., Saïdin, J. B., Dufour, A. & Pennec, G. (2012).** N-acyl homoserine lactone production by bacteria within the sponge *Suberites domuncula* (Olivi, 1792) (Porifera, Demospongiae). *Mar Biol* **159**, 1685-1692.
- Geske, G. D., Wezeman, R. J., Siegel, A. P. & Blackwell, H. E. (2005).** Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J A C S* **127**, 12762-12763.
- Givskov, M., Östling, J., Eberl, L., Lindum, P. W., Christensen, A. B., Christiansen, G., Molin, S. & Kjelleberg, S. (1998).** Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 742-745.
- Giwerzman, B., Jensen, E. T., Høiby, N., Kharazmi, A. & Costerton, J. W. (1991).** Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 1008-1010.
- Holden, M. T. G., Ram Chhabra, S., De Nys, R. & other authors (1999).** Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **33**, 1254-1266.
- Hoshino, T., Takano, T., Hori, S. & Ogasawara, N. (1987).** Biosynthesis of violacein: origins of hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus. *Agric Biol Chem* **51**, 2733-2741.
- Høvik Hansen, G. & Sørheim, R. (1991).** Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. *J Microbiol Methods* **13**, 231-241.
- Huang, Y.-L., Ki, J.-s., Le, O. O. & Qian, P.-Y. (2009).** Evidence for the dynamics of acyl homoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *ISME J* **3**, 296-304.
- Komiya-Ito, A., Ito, T., Yamanaka, A., Okuda, K., Yamada, S. & Kato, T. (2006).** N-Tetradecanoyl homoserine lactone, signaling compound for quorum sensing, inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth. *Res J Microbiol* **1**, 353-359.
- Konzen, M., De Marco, D., Cordova, C. A. S., Vieira, T. O., Antônio, R. V. & Creczynski-Pasa, T. B. (2006).** Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. *Bioorg Med Chem* **14**, 8307-8313.
- Lazazzera, B. A. (2000).** Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin Microbiol* **3**, 177-182.
- Lee, J., Jayaraman, A. & Wood, T. (2007).** Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* **7**, 42.
- Leon, L. L., Miranda, C. C., De Souza, A. O. & Durán, N. (2001).** Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother* **48**, 449-450.
- Lu, Y., Wang, L., Xue, Y. & other authors (2009).** Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochem Eng J* **43**, 135-141.
- Makemson, J. C., Fulayfil, N. R., Landry, W., Van Ert, L. M., Wimpee, C. F., Widder, E. A. & Case, J. F. (1997).** *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1034-1039.
- Mardén, P., Tunlid, A., Malmcrona-Friberg, K., Odham, G. & Kjelleberg, S. (1985).** Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch Microbiol* **142**, 326-332.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. & Jürgens, K. (2004).** Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl and Environ Microbiol* **70**, 1593-1599.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L. & other authors (1997).** Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol SGM* **143**, 3703-3711.

- McLean, R. J. C., Pierson III, L. S. & Fuqua, C. (2004).** A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods* **58**, 351-360.
- Melo, P. S., Maria, S. S., Vidal, B. d., Haun, M. & Durán, N. (2000).** Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellu Dev Biol Anim* **36**, 539-543.
- Mendes, A. S., de Carvalho, J. E., Duarte, M. C. T., Durán, N. & Bruns, R. E. (2001).** Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnol Lett* **23**, 1963-1969.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001).** Quorum Sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-199.
- Morin, D., Grasland, B., Vallée-Réhel, K., Dufau, C. & Haras, D. (2003).** On-line high-performance liquid chromatography -mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J Chromatogr A* **1002**, 79-92.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N. & Ikeda, T. (2008).** N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett* **279**, 124-130.
- Morohoshi, T., Fukamachi, K., Kato, M., Kato, N. & Ikeda, T. (2010).** Regulation of the violacein biosynthetic gene cluster by acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 2116-2119.
- Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C. & Schippa, S. (2007).** Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol* **102**, 992-999.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999).** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Nat Acad Sci* **96**, 11229-11234.
- Rettori, D. & Durán, N. (1998).** Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J Microbiol Biotechnol* **14**, 685-688.
- Rumbaugh, K. P., Chu, W., Vattem, D., Maitin, V., Barnes, M. & McLean, R. C. (2011).** Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*. In *Quorum Sensing*, pp. 3-19: Humana Press.
- Rutherford, S. T. & Bassler, B. L. (2012).** Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect in Med* **2**.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. & Greenberg, E. P. (1996).** Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc National Acad Sci* **93**, 9505-9509.
- Smith, J. N. & Ahmer, B. M. M. (2003).** Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J Bacteriol* **185**, 1357-1366.
- Srivastava, D. & Waters, C. M. (2012).** A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic Di-GMP. *J Bacteriol* **194**, 4485-4493.
- Steindler, L. & Venturi, V. (2007).** Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **266**, 1-9.
- Sutherland, I. W. (2001).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003).** Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**, 2080-2095.

Wang, H., Jiang, P., Lu, Y., Ruan, Z., Jiang, R., Xing, X.-H., Lou, K. & Wei, D. (2009). Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. *Biochem Eng J* **44**, 119-124.

Wang, H., Wang, F., Zhu, X., Yan, Y., Yu, X., Jiang, P. & Xing, X.-H. (2012). Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochem Eng J* **67**, 148-155.

Wang, Y., Ikawa, A., Okaue, S., Taniguchi, S., Osaka, I., Yoshimoto, A., Kishida, Y., Arakawa, R. & Enomoto, K. (2008). Quorum sensing signaling molecules involved in the production of violacein by *Pseudoalteromonas*. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1958-1961.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. & Salmond, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.

Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R. & Enomoto, K. (2008). Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar Biotechnol* **10**, 128-132.

Yang, L. H., Xiong, H., Lee, O. O., Qi, S. H. & Qian, P. Y. (2007). Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett Appl Microbiol* **44**, 625-630.

Zhu, J., Beaber, J. W., Moré, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A. & Winans, S. C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**, 5398-5405.

Zhu, J., Chai, Y., Zhong, Z., Li, S. & Winans, S. C. (2003). *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of *N*-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6949-6953.

Dans cette étude rédigée sous forme d'article, le pigment violet produit par TC14 a été caractérisé par des analyses spectrales comme étant la violacéine. La production de violacéine a été mise en évidence dans deux milieux de culture marins (VNSS et MB) ainsi que dans deux conditions de culture qui sont la condition planctonique et la condition sessile. En conditions planctoniques, TC14 produit de la violacéine uniquement en VNSS et la quantité de violacéine est d'autant plus élevée que la bactérie se trouve en fin de phase stationnaire. En conditions sessiles, TC14 produit de la violacéine aussi bien en VNSS qu'en MB et la quantité de violacéine est environ deux fois plus élevée en VNSS qu'en MB. En comparant la production de violacéine dans les deux conditions de culture, il ressort que TC14 produit plus de violacéine en conditions sessiles qu'en conditions planctoniques. Ainsi, la production de violacéine chez TC14, tout comme celle de certains métabolites secondaires par les bactéries en général peut être régulée en fonction de l'état physiologique dans lequel se trouve la bactérie mais aussi en fonction du milieu de culture.

Au-delà de l'état physiologique et des conditions de culture, la production de violacéine chez TC14 peut aussi être régulée par des molécules exogènes du QS en l'occurrence des AHLs exogènes, et ce, de façon dépendante des conditions de culture. En

effet, en conditions planctoniques, quatre AHLs exogènes (la C₆-HSL, la C₁₂-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL) semblent augmenter significativement la production de violacéine en milieu VNSS, tandis qu'une AHL, la 3-oxo-C₆-HSL semble la diminuer. En revanche, en milieu MB, aucune de ces AHLs n'a montré d'effet sur la production de violacéine. En conditions sessiles, les AHLs exogènes n'ont pas montré d'effet remarquable sur la production de violacéine en VNSS, alors qu'en MB, la 3-oxo-C₈-HSL semble l'augmenter de façon significative. Le fait que TC14 semble répondre à des AHLs exogènes alors qu'elle n'en produit pas, fait suggérer qu'elle pourrait posséder un circuit QS incomplet, avec la présence d'un récepteur homologue de LuxR fonctionnel seul. Cette hypothèse reste toutefois à vérifier (§ perspectives). Cela soulève la possibilité d'utiliser TC14 comme un outil de test marin pour le criblage de molécules pro ou anti QS, dédiées aux applications en milieu marin, en conditions planctoniques et sessiles. D'autres essais, en l'occurrence l'effet des AHLs exogènes sur la formation de biofilm et la motilité de TC14 pourront permettre de corroborer ce point de vue.

Par ailleurs, en conditions sessiles, la violacéine produite par TC14 semble être presque totalement retenue dans les cellules sessiles associées à la matrice extracellulaire. Cela montre que la violacéine pourrait avoir un rôle écologique vis-à-vis des concurrents présents dans l'environnement du biofilm.

2.2. Effet de la concentration des AHLs exogènes sur la production de violacéine

Dans les travaux précédents, les AHLs exogènes ont été testées sur la production de violacéine de TC14 à la concentration finale de 50 µM. Ici, il s'agit de justifier pourquoi le choix de cette concentration, mais aussi de vérifier l'effet dose-réponse des AHLs testées sur la production de violacéine de TC14. Cela permettrait de déterminer la concentration à laquelle un effet seuil pourrait être observé. Pour cela, les AHLs exogènes qui avaient stimulé la production de violacéine à savoir la C₆-HSL, la C₁₂-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL, ont été testées à différentes concentrations sur la production de violacéine de TC14 après 48h d'incubation. La période d'incubation de 48h a été choisie pour réaliser cet essai, parce que la plupart des AHLs testées ont montré un effet stimulateur significatif sur la production de violacéine à partir de 48h. Les AHLs exogènes ont été testées à de faibles concentrations telles que 0,01, 0,1 et 1 µM, mais aussi à des concentrations plus élevées telles

que 10, 25 et 50 μM . Trois réplicats ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans la Figure 55.

La Figure 55a présente les résultats pour les concentrations d'AHLs de 0 à 0,1 μM , la Figure 55b présente les résultats pour les concentrations d'AHLs allant de 0,1 à 1 μM et la Figure 55c présente les résultats pour les concentrations d'AHLs allant de 1 à 50 μM .

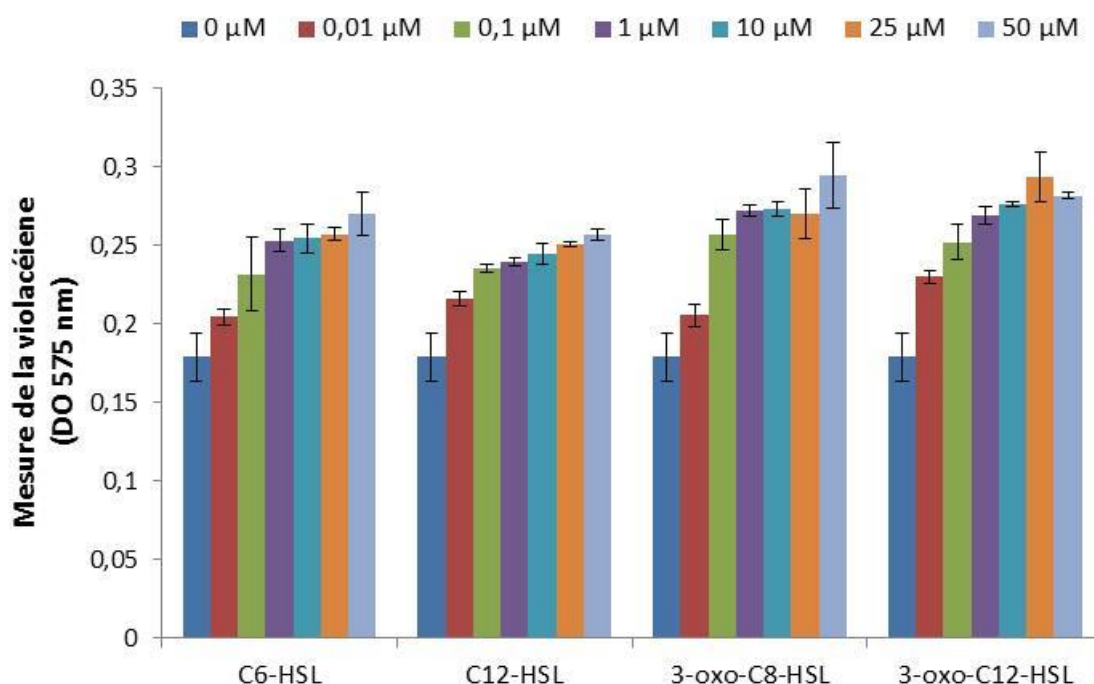


Figure 55 Effet de la concentration des AHLs exogènes sur la production de violacéine de TC14. (a) de 0 à 0,1 μM d'AHLs (b) de 0,1 à 1 μM d'AHLs et (c) de 1 à 50 μM d'AHLs.

La production de violacéine dans la culture témoin de TC14 sans AHLs exogènes (0 μM d'AHLs) est à environ $\text{DO}_{575\text{nm}} = 0,179$. En présence de 0,01 μM d'AHLs, la production de violacéine augmente jusqu'à atteindre environ $\text{DO}_{575\text{nm}} > 0,2$ pour toutes les AHLs. A partir de 0,1 μM jusqu'à 1 μM d'AHLs, la production de violacéine ne varie plus de façon considérable pour la totalité des AHLs (Figure 55b). Sur la Figure 55c, il est observé une faible variation dans la production de violacéine de 1 à 50 μM pour la plupart des AHLs. Il ressort de la Figure 55 qu'un effet seuil dans la production de violacéine semble être atteint à partir de 0,1 μM pour les quatre AHLs testées, puisqu'à partir de cette concentration la quantité de violacéine produite semble être maximale.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'Andersen et *al.* (2001) qui ont indiqué que 10 nM de 3-oxo-C₆-HSL induisaient une production maximale de la protéine GFP

chez la souche *E. coli* MT102. Au-delà de cette concentration et jusqu'à 100 nM, la quantité de protéine GFP était légèrement supérieure. Ces résultats sont aussi en accord avec plusieurs travaux dans la littérature dans lesquels certaines AHLs se sont montrées actives avec l'obtention d'un effet seuil à faibles concentrations dans l'ordre du nanomolaire. McClean et collaborateurs en 1997 ont montré que la synthèse de la violacéine par la souche *C. violaceum* CV026 était induite par des concentrations de la C₆-HSL allant de 1 à 5 µM. Chez la même bactérie, Martinelli *et al.* (2004) ont aussi montré que des concentrations de C₆-HSL aussi faibles que 0,37 nM étaient capables de déclencher la synthèse de la violacéine. Zhu et collaborateurs (1998) ont montré que la souche *A. tumefaciens* WCF74 était sensible à de faibles concentrations de 3-oxo-C₈-HSL telles que 0,1 nM. Selon ces auteurs, l'effet seuil dans la production de la β-galactosidase serait atteint à partir de 10 nM de la 3-oxo-C₈-HSL. Un autre exemple est l'émission de la bioluminescence chez *V. fischeri*, qui serait déclenchée à des concentrations de 10 à 100 nM de l'autoinducteur 3-oxo-C₆-HSL (Kaplan & Greenberg, 1985 ; Whitehead *et al.*, 2001). Pearson *et al.* en 1995 ont également démontré que chez *P. aeruginosa*, la moitié de l'activité maximale de la 3-oxo-C₁₂-HSL était obtenue à partir de 1 nM. Par ailleurs, d'autres récepteurs du QS sont stimulés par de fortes concentrations de molécules inductrices. C'est le cas du récepteur SdiA chez *E. coli* qui est activé par 100 µM de C₄-HSL (Lindsay & Ahmer, 2005).

Dans cette étude, le fait que la violacéine produite par TC14 atteigne une valeur maximale en présence de faibles concentrations d'AHLs exogènes telles que 0,1 µM fait penser qu'il pourrait bien exister un effet de type *quorum sensing*, avec l'obtention d'un seuil de saturation comme dans le cas de la production de la protéine GFP chez la souche *E. coli* MT102, qui sature en présence de 10 nM de 3-oxo-C₆-HSL (Andersen *et al.*, 2001).

Le choix de tester les AHLs exogènes à 50 µM dans la majorité des bio-essais réalisés dans cette étude a été fait en se basant sur des informations relatives aux concentrations d'AHLs utilisées à la fois dans les tests d'induction et d'inhibition du QS. Concernant l'induction du QS, le choix de 50 µM d'AHLs s'est fait en se référant aux expérimentations de Wang et collaborateurs en 2008, à propos de la production de violacéine chez la souche *Pseudalteromonas* sp. 520P1. En effet, les auteurs dans l'objectif de vérifier laquelle de la 3-oxo-C₈-HSL ou de la C₁₄-HSL induisait la production de violacéine chez cette bactérie ont testé les deux molécules respectivement à 48 µM et 62 µM. Seule la 3-oxo-C₈-HSL augmentait la production de violacéine à 48 µM. Selon nos réflexions, la concentration de 50 µM, qui est encadrée par les deux concentrations précitées pourrait largement permettre

d'observer un effet des AHLs exogènes sur la production de violacéine, la formation de biofilm ou encore la motilité de TC14, sans risquer un effet cytotoxique (Fig. S6 § article). Quant à l'inhibition du QS, il ressort dans la littérature que pour les tests d'inhibition du QS, les molécules sont très souvent testées à fortes concentrations et semblent montrer un effet inhibiteur à des concentrations supérieures ou égales à 50 μM . C'est l'exemple de Geske *et al.* en 2005 qui ont traité le biofilm de *P. aeruginosa* en présence de 50 μM d'AHLs synthétiques. En effet, 50 μM de deux AHLs synthétiques (l'indole-AHL et le bromophényl-AHL) inhibaient le biofilm de *P. aeruginosa*. Aussi, Martinelli et collaborateurs (2004) ont montré que la synthèse de violacéine, induite par 0,37 μM de C₆-HSL était inhibée en présence de 100 μM de furanones synthétiques. En plus, Dobretsov et collaborateurs en 2011 ont montré que 36 μM d'acide kojique suffisent à inhiber l'activité du récepteur LuxR, induite par la 3-oxo-C₆-HSL.

3. Effet des AHLs exogènes sur la motilité de TC14

Dans cette expérimentation, les AHLs exogènes qui avaient montré un effet activateur (C₆-HSL, C₁₂-HSL, 3-oxo-C₈-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL) mais aussi un effet inhibiteur (3-oxo-C₆-HSL) sur la production de violacéine ont été testées sur le swimming et le swarming, deux modes de motilité effectués par TC14. Le twitching n'a pas été testé chez TC14. En effet, selon les résultats de Brian-Jaisson *et al.* en 2014, TC14 ne ferait pas de twitching. Les AHLs exogènes ont donc été testées sur la motilité de TC14 à la concentration finale de 50 μM , comme précédemment pour la violacéine. Les résultats de l'effet des AHLs exogènes sur la motilité par swimming et par swarming de TC14 sont présentés par les Figures 56a et 56b.

La Figure 56a montre que TC14 est capable de réaliser du swimming en milieu VNSS agar ($\varnothing = 3$ cm), c'est-à-dire qu'elle est capable de se déplacer à travers les canaux d'eau sur la gélose. En présence de 50 μM d'AHLs exogènes telles que la C₁₂-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL, le swimming de TC14 semble être réduit de façon significative ($p < 0,05$) ($\varnothing =$ environ 1,8 cm). L'effet des AHLs exogènes sur le swimming est montré en images dans la Figure 57.

La Figure 56b montre l'effet des AHLs exogènes sur le swarming de TC14. Il ressort qu'après 48h d'incubation TC14 réalise un faible swarming ($\varnothing = 6,5$ mm). La plupart des AHLs exogènes testées à 50 μM semblent ne pas affecter le swarming de TC14. Toutefois, en présence de la 3-oxo-C₆-HSL, le swarming semble être augmenté ($\varnothing = 7,1$ mm), mais pas de manière significative ($p > 0,05$).

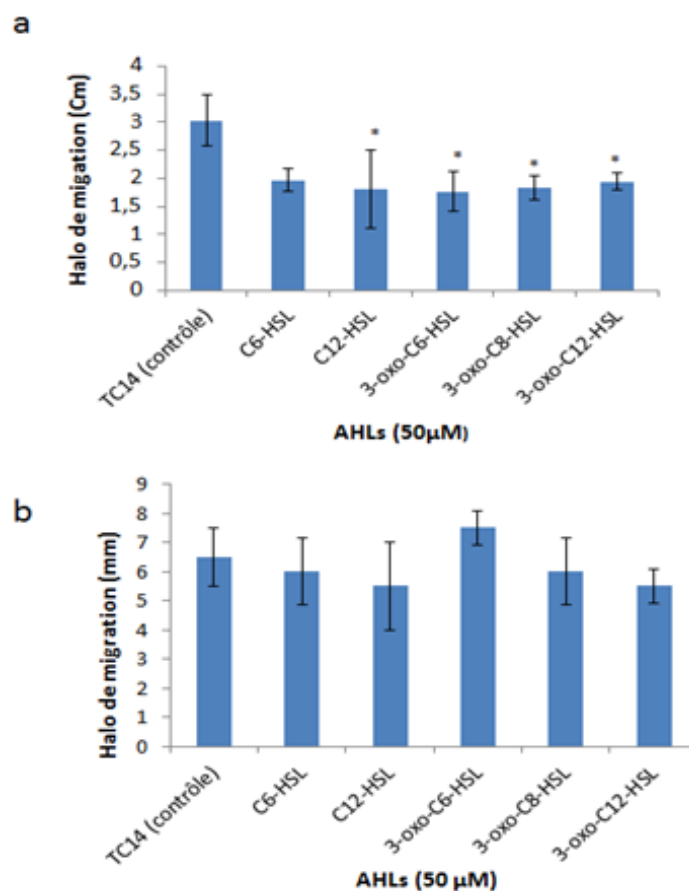


Figure 56 Effet des AHLs exogènes à 50 µM sur la motilité de TC14.

(a) par swimming (b) par swarming. Chaque essai a été réalisé en triplicats. Les essais marqués par des astérisques sont significativement différents ($p < 0,05$) par rapport au contrôle (culture de TC14 sans AHLs).

La littérature fait état du swarming chez plusieurs bactéries qui peut être inhibé en présence de diverses molécules anti-QS telles que les dicétopipérazines, les furanones, les biosurfactants etc... (Daniels *et al.*, 2004) ou encore en présence d'analogues d'AHLs. C'est l'exemple de la furanone halogénée (5Z)-4-bromo-5-(bromométhylène)-3-butyl-2(5H)-furanone qui inhibe le swarming par inhibition du QS d'*E. coli* XL1-Blue (Ren *et al.*, 2001). C'est aussi l'exemple d'une furanone halogénée, isolée de l'extrait de l'algue rouge *D. pulchra*, qui affecte le swarming de *Proteus mirabilis*, sans toutefois affecter la croissance et le swimming de la bactérie (Gram *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'analogue AHL C₉-CPA a été décrit comme inhibiteur du swarming de *Serratia marcescens* AS-1 (Morohoshi *et al.*, 2007). Un autre exemple est celui de la bactérie *P. mirabilis* chez qui la même protéine RmsA supprime le swarming sans affecter le swimming (Liaw *et al.*, 2003). Ces observations sont contraires aux cas du swimming et du swarming de TC14 ou encore de TC15 et 4M6 chez qui le swarming n'est pas affecté par des AHLs exogènes, mais plutôt le swimming. Cela montre que quand bien même les deux types de mobilité pourraient impliquer les mêmes appendices

en l'occurrence les flagelles, les molécules exogènes peuvent avoir des effets sur l'un et non sur l'autre. Chez certaines bactéries telles que les entérobactéries et des espèces du genre *Bacillus*, les deux sortes de motilité (swimming et swarming) seraient souvent commandées par les mêmes dispositifs flagellaires (Daniels *et al.*, 2004). TC14 qui semble être déficiente en production d'AHL, pourrait être sensible à certaines molécules du QS exogènes, en l'occurrence des AHLs exogènes qui affectent sa motilité, particulièrement le swimming. Selon Daniels *et al.* (2004), des molécules du QS telles que les AHLs, les dicétopipérazines ou encore les furanones sont susceptibles d'influencer le comportement swarming ou swimming régulé par le QS chez des bactéries différentes de la bactérie productrice.

Parmi les AHLs exogènes actives sur le swimming, deux semblent posséder une activité variée pour s'être déjà révélées actives de façon significative à la fois sur l'adhésion et la production de violacéine de TC14. Il s'agit de la 3-oxo-C₈-HSL et de la 3-oxo-C₁₂-HSL. Ces deux molécules ont montré une activité inhibitrice sur l'adhésion et sur le swimming ainsi qu'une activité stimulatrice sur la synthèse de violacéine. Cette activité variée des deux AHLs peut être comparable à celle de la furanone halogénée. En effet la furanone halogénée inhiberait la production de violacéine de *C. violaceum* CV026 (Martinelli *et al.*, 2004). Elle aurait également un effet inhibiteur sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2002) ainsi que sur la mobilité par swarming de *S. liquefaciens* (Rasmussen *et al.*, 2000). A l'opposé de ces deux AHLs, la 3-oxo-C₆-HSL a montré un effet uniquement inhibiteur sur presque tous les phénotypes de TC14 testés jusqu'alors.

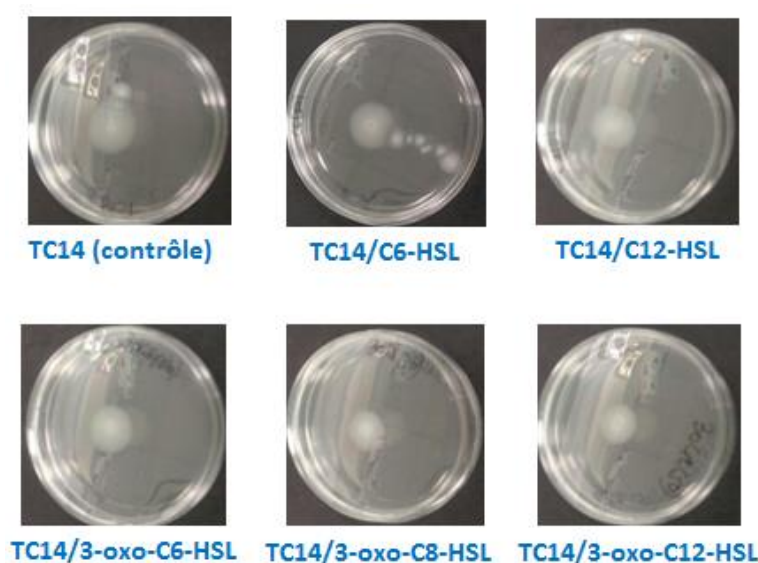


Figure 57 Images de l'effet des AHLs exogènes sur le swimming de TC14

4. Effet des AHLs exogènes sur le biofilm de TC14

Les AHLs exogènes C₆-HSL, C₁₂-HSL, 3-oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL et 3-oxo-C₁₂-HSL ont cette fois-ci été testées sur la formation de biofilm de TC14. L'objectif était de vérifier si la formation de biofilm pourrait être régulée par des AHLs exogènes comme c'est dans le cas de la production de violacéine. L'effet des AHLs exogènes a donc été testé sur la masse de biofilm et la maturation du biofilm formé par TC14.

4.1. Sur la masse de biofilm formé

Afin de vérifier si les AHLs exogènes peuvent influencer la quantité de biofilm formé par TC14, les AHLs exogènes ont été rajoutées à la concentration finale de 50 µM dans une culture de TC14 en MB et en VNSS. Après 72h de culture, le biofilm a été gratté, séché au lyophilisateur et la masse du résidu sec a été mesurée. La masse de biofilm exprimée en gramme prend en compte la biomasse cellulaire et la matrice extracellulaire. La Figure 58 donne les résultats de la masse de biofilm formé pour 50 mL de culture de TC14, en présence ou en absence de 50 µM d'AHLs exogènes, après 72h de culture en milieux VNSS et MB.

Dans un premier temps, la masse de biofilm formé par TC14 a été comparée entre les milieux de culture. Aucune différence significative n'a été constatée dans la masse de biofilm formé par TC14 en VNSS (m = 0,25 g) et en MB (m = 0,29 g). Dans un second temps, la masse de biofilm du contrôle (culture de TC14 sans ajout d'AHL) a été comparée à la masse de biofilm issue de chaque traitement (culture de TC14 en présence d'AHL exogène) dans les deux milieux de culture. En milieu MB, il n'y a pas de différence significative entre la masse de biofilm du contrôle et celle des différents traitements (Figure 58a). En milieu VNSS, la masse de biofilm de TC14 semble être augmentée en présence de la 3-oxo-C₆-HSL (m = 0,29 g), tandis que la 3-oxo-C₈ HSL semble plutôt la réduire (m = 0,21 g). Toutefois pour ces deux AHLs, aucun effet significatif n'a été observé (p > 0,05) (Figure 58b).

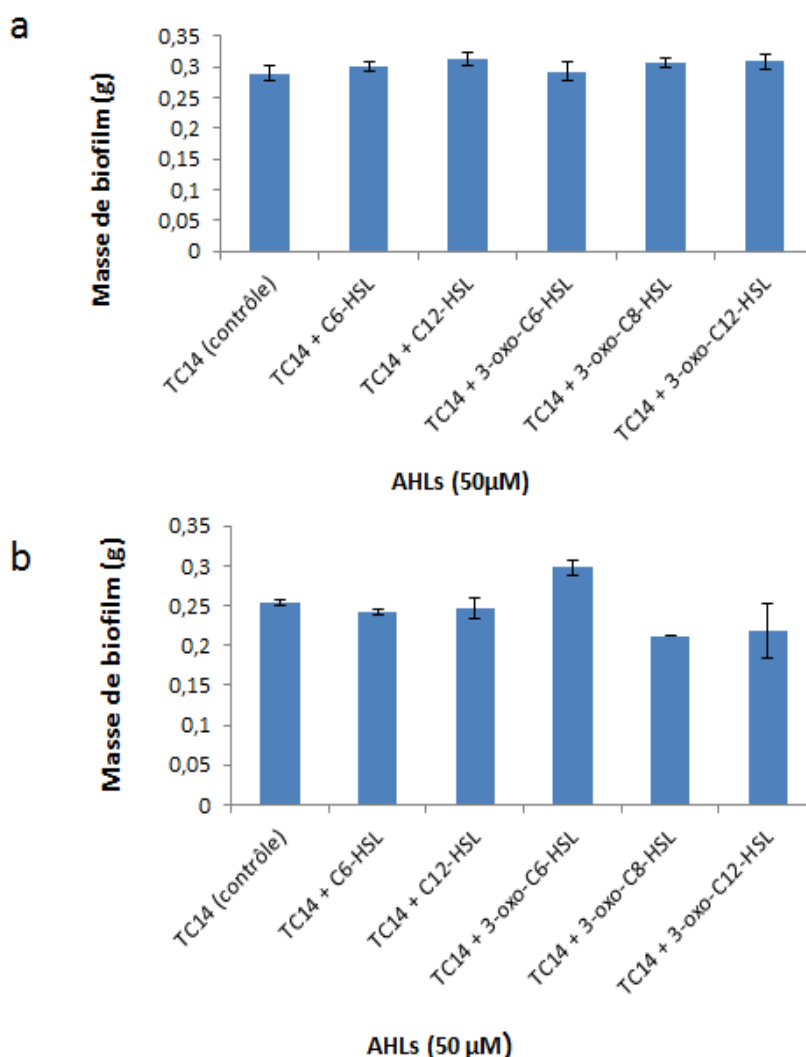


Figure 58 Effet des AHLs exogènes sur la masse de biofilm formé par TC14. Pour 50 mL de culture à 72h (a) en MB (b) en VNSS. Trois réplicats ont été réalisés. Aucune différence significative n'est observée entre le contrôle (culture de TC14 sans AHLs) et les traitements en présence d'AHLs.

Il est connu que les molécules du QS en l'occurrence les AHLs exogènes peuvent avoir une forte influence sur la structure du biofilm formé par les bactéries. Haras en 2005 a mis en évidence le fait que des AHLs exogènes peuvent affecter la faculté à former un biofilm chez des bactéries marines non productrices d'AHLs. Une autre étude réalisée par Asahi *et al.* en 2010 a révélé que des analogues d'AHLs influençaient la formation de biofilm chez la souche *P. gingivalis* 381. TC14 est une bactérie marine chez qui aucune production d'AHL n'a été détectée, mais qui cependant semble être sensible à des molécules exogènes du QS qui interviennent dans la régulation de certains de ces comportements, dont la production de violacéine et le swimming, mais pas dans la masse du biofilm. En effet, dans l'ensemble, les

AHLs exogènes testées n'ont pas montré d'effet significatif sur la masse de biofilm formé par TC14, quel que soit le milieu de culture utilisé.

La mesure de la masse de biofilm est une méthode quantitative dans l'étude des biofilms bactériens. Elle peut être considérée comme une méthode de quantification intéressante dans les cas de traitement de biofilm en présence de molécules exogènes, en complément des techniques de quantifications, telles que l'utilisation des microplaques et des techniques microscopiques.

4.2. BFRT

Une autre méthode de l'étude du biofilm de TC14 a été l'évaluation de la capacité de la bactérie à former un biofilm en présence des AHLs exogènes à partir du BioFilm Ring Test®. Le BFRT® a été décrit pour la première fois par Chavant et collaborateurs en 2007 comme une nouvelle méthode d'étude de biofilm, rapide, moins fastidieuse et reproductible, comparée aux méthodes ancestrales d'études de biofilms telles que la microscopie et le cristal violet.

Les AHLs n'ayant jamais été testées auparavant sur la croissance de TC14 à des concentrations supérieures à 50 μM , il a paru intéressant de vérifier qu'à des concentrations plus élevées telles 100 et 200 μM , elles n'affectent pas la croissance de la bactérie. Ceci, afin d'éviter de faux positifs d'inhibition de biofilm dû en réalité à une inhibition de la croissance. Pour cela, un représentant des deux types d'AHLs qui ont fait l'objet de cette étude, à savoir les AHLs à chaîne latérale non substituée ($\text{C}_6\text{-HSL}$) et les AHLs avec une substitution oxo (3-oxo- $\text{C}_8\text{-HSL}$) ont été choisies. En plus de ces AHLs, la 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$ a été choisie parce qu'étant la seule AHL ayant montré un effet inhibiteur sur la production de violacéine de TC14 dans les paragraphes précédents (§ article). L'effet de la $\text{C}_6\text{-HSL}$, de la 3-oxo- $\text{C}_8\text{-HSL}$ et la 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$ à 100 et 200 μM sur la cinétique de croissance de TC14 est présenté par la Figure 59.

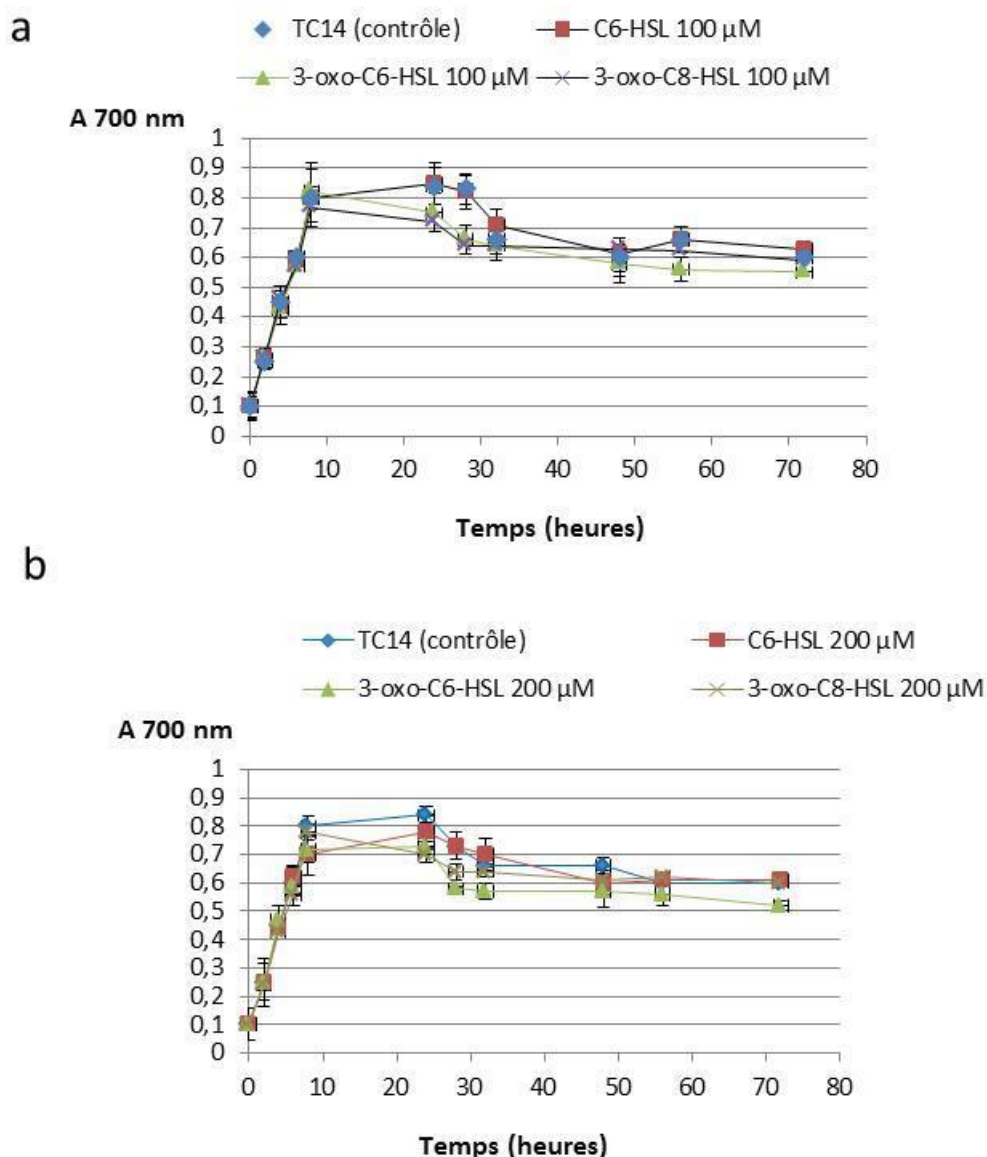


Figure 59 Cinétique de croissance de TC14 en présence d'AHLs exogènes
(a) en présence de 100 µM d'AHLs exogènes (b) en présence de 200 µM d'AHLs exogènes

A 100 µM, aucune des trois AHLs testées n'affecte la croissance de TC14 aux vingt premières heures de croissance. Au-delà de 20h de croissance, il est noté une légère baisse de la croissance de la bactérie en présence de la 3-oxo-C₆-HSL et la 3-oxo-C₈-HSL mais cette décroissance n'est pas significativement différente de celle du contrôle sans AHLs ($p > 0,05$). La C₆-HSL quant-à-elle ne montre aucun effet sur la croissance de TC14 jusqu'à 72h.

En présence de 200 µM d'AHLs, tout comme à 100 µM, il est constaté que jusqu'à 10h d'incubation, aucune AHL ne semble affecter la croissance de TC14. Après 20h d'incubation, la croissance de TC14 en présence d'AHLs exogènes décline mais de façon similaire à la croissance de TC14 sans AHLs.

Partant du constat selon lequel à 100 et à 200 μM les AHLs exogènes semblent ne pas influencer de façon significative la croissance de TC14, les AHLs ont été testées à 50, 100 et 200 μM sur la capacité à former du biofilm de TC14 en milieu MB. Les résultats ont été exprimés en indice de formation de biofilm comme illustré dans la Figure 60.

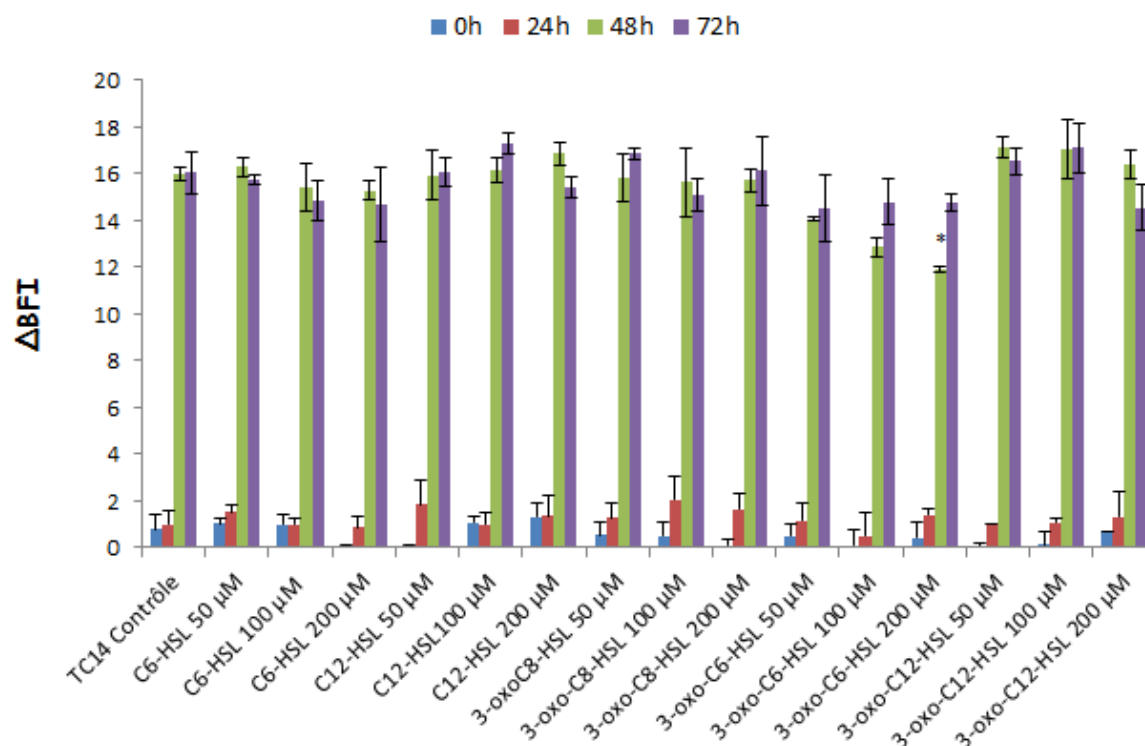


Figure 60 Cinétique de la formation de biofilm en microplaque en présence d'AHLs exogènes. L'indice de formation de biofilm a été mesuré pour chaque essai et le ΔBFI {(BFI du milieu seul avec ou sans AHLs) – (BFI de la culture de TC14 avec ou sans AHLs)} a été calculé à partir du logiciel BioFilm Control. Le milieu MB a été utilisé pour réaliser cette expérimentation. Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicats. Les expériences marquées d'astérisques se sont révélées significativement différentes ($p < 0,05$), comparée au contrôle (culture de TC14 sans AHLs) au temps indiqué.

Comme décrit chez TC15, l'étude du biofilm de TC14 par le BFRT® a été effectuée en milieu MB. Le milieu MB est un milieu suffisamment riche pour induire un biofilm conséquent, en l'occurrence une forte croissance, suivie d'une forte production d'EPS (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Les expériences précédentes ont montré qu'en milieu MB, TC14 croît deux fois plus qu'en VNSS. En plus, Brian-Jaisson *et al.* (2014) ont révélé que le milieu MB est propice pour la culture en biofilm des souches marines de la collection de Toulon. L'avantage d'utiliser le BFRT® pour l'évaluation du biofilm bactérien est que cette méthode permet non seulement d'avoir des informations sur le début de la production de la matrice extracellulaire, mais aussi sur l'évolution du biofilm. En effet, la densité du biofilm en terme de bactéries et de matrice extracellulaire empêchent les microbilles magnétiques de migrer au

centre du puits et de former un spot visible (Brian-Jaisson *et al.*, 2014; Chavant *et al.*, 2007). L'autre avantage est que cet outil permet une analyse quantitative de la formation de biofilm, puisqu'elle peut mesurer le déplacement des microbilles au cours de la formation du biofilm.

La Figure 60 montre qu'en milieu MB, jusqu'à 24h d'incubation, TC14 ne produit pas de biofilm ($\Delta\text{BFI} < 2$). Le biofilm n'étant pas encore formé à 24h, les microbilles migrent normalement au centre des puits (Figure 61), comme c'est le cas pour l'inoculum de départ (t_0). Il se pourrait que jusqu'à 24h d'incubation, TC14 soit encore au stade de l'adhésion. La formation de biofilm, en l'occurrence la production de la matrice extracellulaire pourrait ne démarrer qu'après 24h d'incubation, avec un indice de formation de biofilm ΔBFI supérieur à 15 ($\Delta\text{BFI} > 15$), atteint à 48h d'incubation. A 72h d'incubation, le ΔBFI de TC14 ne varie plus de celui de 48h ; ce qui signifierait qu'à 72h, et dans ces conditions, le biofilm ne peut plus se développer et pourrait au-delà de 72h commencer à décliner (lyse, essaimage..). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Brian-Jaisson *et al.* (2014). La capacité à former un biofilm de TC14 a aussi été évaluée en présence des AHLs exogènes $\text{C}_6\text{-HSL}$, $\text{C}_{12}\text{-HSL}$, 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$, 3-oxo- $\text{C}_8\text{-HSL}$ et 3-oxo- $\text{C}_{12}\text{-HSL}$. Il est noté que la présence des AHLs exogènes n'induit pas la formation du biofilm de TC14 à 24h d'incubation. A 48h d'incubation, alors que le biofilm de TC14 est déjà formé, les AHLs testées semblent ne pas montrer d'effet remarquable même à 200 μM à l'exception de la 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$. En effet, la 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$ semble diminuer le biofilm de TC14 à 48h d'incubation à partir de 50 μM , avec un effet significatif ($p < 0,05$) à 200 μM ($\Delta\text{BFI} \geq 11$). A 72h d'incubation, la 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$ n'a pas d'effet remarquable et significatif sur la formation de biofilm de TC14. L'effet d'inhibition du biofilm de TC14 par la 3-oxo- $\text{C}_6\text{-HSL}$ est présenté en image par la Figure 61

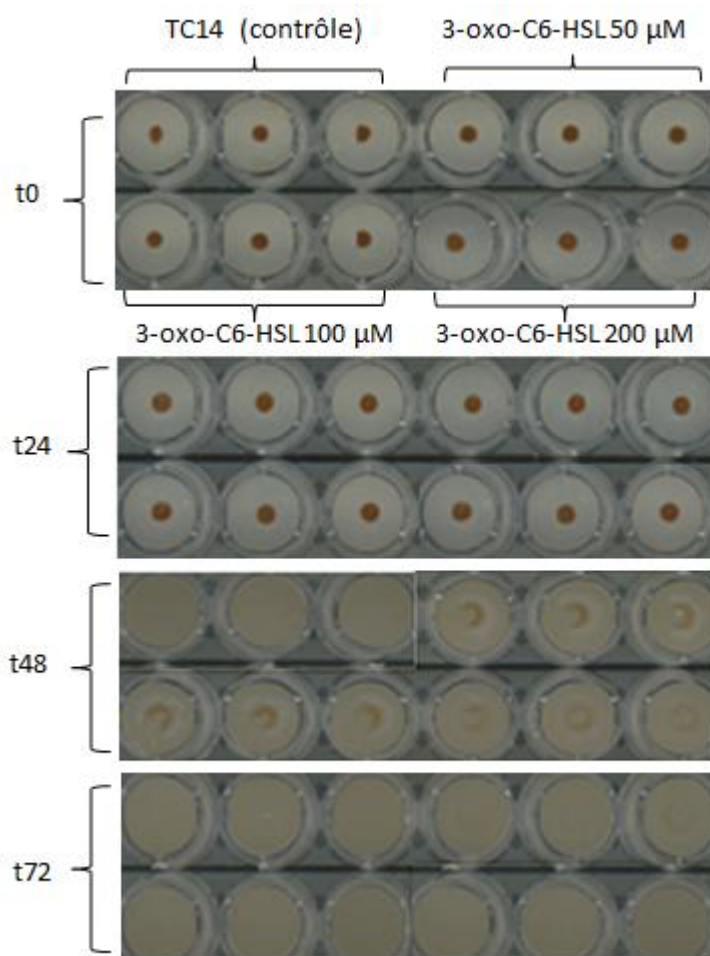


Figure 61 Images de l'effet de la 3-oxo-C₆-HSL sur la formation de biofilm de TC14. Pour chaque couple de barrette, les trois puits à droite sur la deuxième barrette représentent le témoin (culture de TC14 sans AHLs). Les autres puits représentent les puits inoculés avec la 3-oxo-C₆-HSL.

Sur la Figure 61, en présence ou en absence de 3-oxo-C₆-HSL les microbilles ont été mobiles entre 0 et 24h d'incubation, car elles forment un spot foncé au centre des puits. A 48h d'incubation, il n'y a pas de spot visible dans les puits contrôles ; ce qui signifie qu'il y a bien du biofilm formé. Dans les puits contenant la 3-oxo-C₆-HSL, il est observé une formation d'anneaux (« Rings ») plus ou moins foncés à 48h. Les microbilles ont été freinées dans leur déplacement, dû à un début de production de matrice. A 72h d'incubation, il n'y a pas de spot visible ; ce qui signifie qu'il y'a un biofilm formé dans tous les cas.

La Figure 61 permet d'observer ce qu'a mis en évidence l'évaluation quantitative ; la 3-oxo-C₆-HSL retarde la formation de biofilm de TC14 à 48h de culture. Comme l'avais mentionné Haras en 2005. Certaines AHLs non natives pourraient influencer l'adhésion et la formation de biofilm chez des bactéries non productrices d'AHLs (Haras, 2005). Cela pourrait

bien être le cas de la 3-oxo-C₆-HSL chez TC14, à 48h. Le fait que ce retard ne soit pas détectable au temps suivant (72h) peut suggérer que l'action de la molécule pourrait être compensée par le développement du biofilm qui n'est que retardé sans être complètement inhibé. Ceci explique que la différence ne soit pas significative à 72h. Il est possible qu'une concentration supérieure à 200 µM provoque un effet inhibiteur plus marqué pouvant être observé jusqu'à 72h ou au-delà. La littérature décrit des molécules de structure proche des AHLs telle que la furanone halogénée qui inhibe la formation des biofilms bactériens par le blocage du système QS de ces bactéries. Ainsi, la furanone a été décrite comme inhibiteur du biofilm de 24h de la souche *P. aeruginosa* PAO-JP2 à de faibles concentrations, par répression de l'expression du gène *lasB* impliqué dans la formation de biofilm (Hentzer *et al.*, 2002). C'est aussi le cas de la furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromométhylène)-3-butyl-2(5H)-furanone qui inhibe la formation du biofilm d'*E. coli* XL1-Blue en diminuant son épaisseur de 55% (Ren *et al.*, 2001). En plus de la furanone halogénée, d'autres molécules naturelles ont montré un effet inhibiteur sur des biofilms bactériens. Un exemple est la S-phényl-L-cystéine sulfoxide qui inhibe le biofilm de *P. aeruginosa* à 1 mM (Cady *et al.*, 2012). Geske *et al.* (2005) ont rapporté que des molécules AHLs non natives inhibaient la formation de biofilm de *P. aeruginosa* à partir de 50 µM. En outre, des enzymes telles que les lactonases ou les acylases ont aussi été décrites dans la littérature comme étant des inhibiteurs potentiels du QS des bactéries et donc de la formation de biofilm. Elles inactivent les AHLs impliquées dans la formation du biofilm de certaines bactéries par clivage du groupement lactone ou de la chaîne acyle (Dong & Zhang, 2005).

Il est bien ici de mentionner l'activité inhibitrice très intéressante qu'a exercée la 3-oxo-C₆-HSL à 200 µM, à la fois sur l'adhésion et la formation de biofilm de TC14. Elle a également montré un effet inhibiteur sur le swimming et sur la production de violacéine à 50 µM et à 100 µM.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, il s'est agi de tester l'effet des molécules exogènes du QS, en l'occurrence les AHLs exogènes sur la production de violacéine, la motilité et la formation de biofilm de la souche *P. ulvae* TC14. Cette étude a révélé que la production de violacéine de TC14 peut être régulée par certaines AHLs exogènes dont la C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL, et la 3-oxo-C₁₂-HSL. Cette régulation se trouve également être dépendante du milieu de culture et l'état physiologique dans lequel se trouve la bactérie. L'étude de la violacéine semble être intéressante pour deux raisons principales. D'une part, elle peut se révéler être un marqueur de l'influence des AHLs ou de leurs homologues sur le QS, même si cela ne préjuge pas de l'effet réel que pourraient avoir ces molécules sur d'autres phénotypes. D'autre part, cette étude met en évidence des effets d'induction de la production de violacéine dans les conditions utilisées chez cette souche, pouvant peut-être se révéler intéressantes pour des applications dans des domaines autres que le secteur marin, impliquant l'utilisation de molécules antibactériennes. Un autre aspect de cette étude a été de tester les AHLs exogènes sur la motilité par swimming et par swarming de TC14. Ainsi, la C₁₂-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL diminuent de façon significative le swimming de TC14, sans affecter le swarming. En ce qui concerne la formation de biofilm, il ressort que TC14 produit à peu près la même masse de biofilm en VNSS et en MB. La capacité à former du biofilm de TC14, évaluée en MB par le test BFRT® a montré que le biofilm de TC14 est formé après 48h d'incubation. L'étude de la régulation de la formation de biofilm par les AHLs exogènes a révélé que la 3-oxo-C₆-HSL ralentit la formation de biofilm à 48h d'incubation. Les autres AHLs semblent ne pas influencer la formation de biofilm de TC14. L'inhibition des biofilms bactériens ainsi que l'inhibition de l'adhésion et de la motilité des bactéries reste une alternative à la recherche de solutions antifouling, notamment lorsqu'il s'agit de molécules biologiques non toxiques telles que les AHLs.

Chapitre V :
Tests préliminaires d'inhibition
du QS avec TC14

1. Introduction

Les stratégies antifouling se sont orientées de nos jours vers l'inhibition du QS des bactéries marines afin de réduire au mieux la formation de biofilm et l'établissement du biofouling. Le QS bactérien peut être inhibé par des molécules d'origines naturelles et/ou synthétiques. A cet effet, le laboratoire MAPIEM dispose d'un grand nombre de composés originaux, naturels, issus d'organismes marins ou de molécules synthétiques conçus à partir de modèles connus. Ces composés peuvent donc être criblés dans le but de déterminer leur éventuel effet inhibiteur sur le QS des bactéries. Le criblage des molécules QSIs implique l'utilisation de bactéries biosenseurs capables de détecter des analogues structuraux ou fonctionnels des AHLs. Ces analogues pourraient inhiber le système QS présent chez les biosenseurs. L'un des biosenseurs le plus utilisé dans les tests d'inhibition du QS est *C. violaceum* chez qui l'inhibition du QS consiste à réduire ou à inhiber la production de violacéine qui est normalement sous le contrôle du QS à travers la C₆-HSL (Martinelli *et al.*, 2004; McLean *et al.*, 2004).

Dans le chapitre précédent, il a été démontré que la souche marine *P. ulvae* TC14 produit de la violacéine qui est régulée par des molécules exogènes du QS sous certaines conditions. Les conditions sous lesquelles TC14 répond aux mieux aux AHLs exogènes sont de la cultiver en conditions planctoniques, en milieu VNSS ou en conditions sessiles, en VNSS ou en MB. L'objectif à moyen terme est d'utiliser TC14 comme un outil de tests pour la détection des molécules du QS chez des bactéries marines en conditions salines, en particulier pour le screening de molécules inhibitrices du QS (QSIs). Ceci en se basant sur les connaissances disponibles relatives au biosenseur *C. violaceum* 12472 (Rumbaugh *et al.*, 2011a) qui comme TC14, produit de la violacéine et n'est pas modifié génétiquement. L'inhibition du QS chez TC14 devrait, tout comme chez 12472 se traduire par une inhibition partielle ou complète de la production de violacéine.

Ce dernier chapitre sera consacré à l'utilisation de TC14 en tant qu'outil, en parallèle avec le biosenseur de référence *C. violaceum* 12472 (McLean *et al.*, 2004) dans les tests d'inhibition du QS. D'abord, les extraits de bactéries marines ont été testés sur la production de violacéine de TC14. Ensuite, une référence positive d'inhibition de la production de violacéine a été recherchée. Enfin, des composés commerciaux ainsi que des analogues synthétiques de molécules naturelles ont été testés sur la production de violacéine de TC14 et sur le QS de *C. violaceum* 12472.

2. Tests d'inhibition du QS à partir de bactéries marines et leurs extraits

Les premiers tests d'inhibition du QS avec TC14 en tant que biosenseur ont été réalisés avec des bactéries marines et leurs extraits organiques. Ainsi, les extraits de bactéries marines ont été testés sur le QS de TC14, en évaluant la production de violacéine en culture liquide. D'autre part, les bactéries marines vivantes ont été mises en contact en milieu gélosé (VNSSA) avec TC14, afin de visualiser une éventuelle inhibition de la violacéine produite par TC14.

2.1. QSI avec les extraits de bactéries marines

Les extraits organiques des bactéries marines TC8, TC15, 4M6 ainsi que l'extrait de TC14 elle-même ont été testés sur la production de violacéine de TC14, cultivée en milieu VNSS, en conditions planctoniques. Les extraits ont été au préalable testés sur la croissance de TC14, afin de s'assurer qu'une inhibition de la croissance de la bactérie ne soit à l'origine d'une éventuelle inhibition de la production de violacéine, donc de la réponse QS de TC14. La Figure 62 montre les résultats de l'effet des extraits de bactéries marines sur la croissance de TC14 en VNSS, réalisé en trois réplicats.

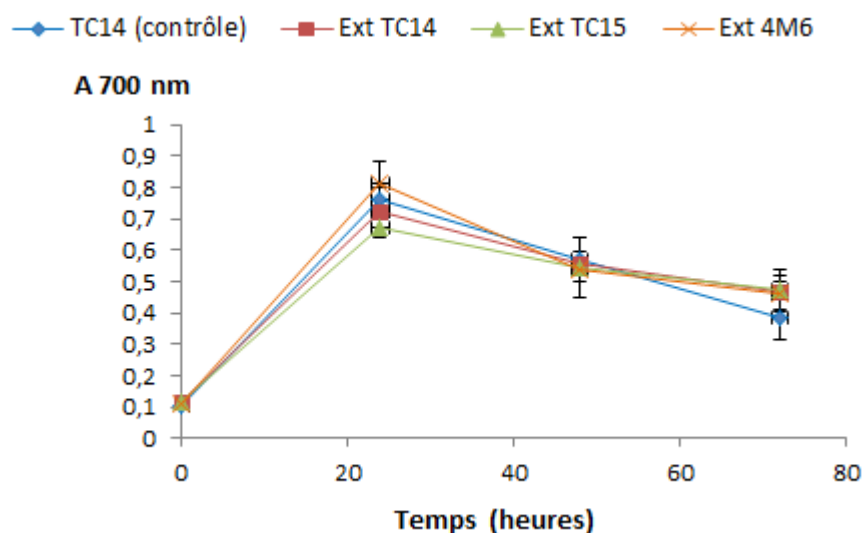


Figure 62 Effet des extraits de bactéries marines sur la croissance de TC14. Les expériences ont été réalisées en VNSS. La croissance a été suivie par la mesure de l'absorbance à 700 nm à différents temps de croissance. Les expériences ont été réalisées en trois réplicats avec des cultures différentes.

La Figure 62 montre que les extraits de bactéries testés n'ont pas d'effet sur la cinétique de croissance de TC14. D'une manière générale dans les tests d'inhibition du QS, les molécules sont d'abord testées sur la croissance de la bactérie utilisée comme biosenseur. Selon Choo *et al.* (2006), il est important de vérifier que les molécules ou les extraits naturels testés en anti QS n'affectent pas la croissance des bactéries, afin d'être certain que l'interférence de ces molécules avec le QS ne soit pas en réalité une activité antibactérienne. Dobretsov et collaborateurs en 2011 avaient testé 78 composés naturels issus de différents organismes marins sur la croissance du biosenseur CV017 et ont observé qu'une faible proportion de ces composés présentait une activité antibactérienne. Martinelli et collaborateurs en 2004 avaient également vérifié que les furanones naturelles et synthétiques testées sur le QS de *C. violaceum* CV026 n'affectaient pas la croissance de la bactérie. De plus, Dheilly et collaborateurs (2010) ont également mentionné que le surnageant de culture de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 inhibait le biofilm de 4M6 sans affecter sa croissance.

Après s'être assuré que les extraits de TC8, TC14, TC15 et 4M6 n'affectent pas la croissance de TC14, ils ont été testés sur la production de violacéine. Toutes les 24h, la violacéine produite par TC14 en présence d'extraits de bactéries est extraite, dosée et comparée à celle de TC14 sans extraits de bactérie. La Figure 63 présente les résultats de l'effet des extraits de bactéries marines sur la production de violacéine de TC14.

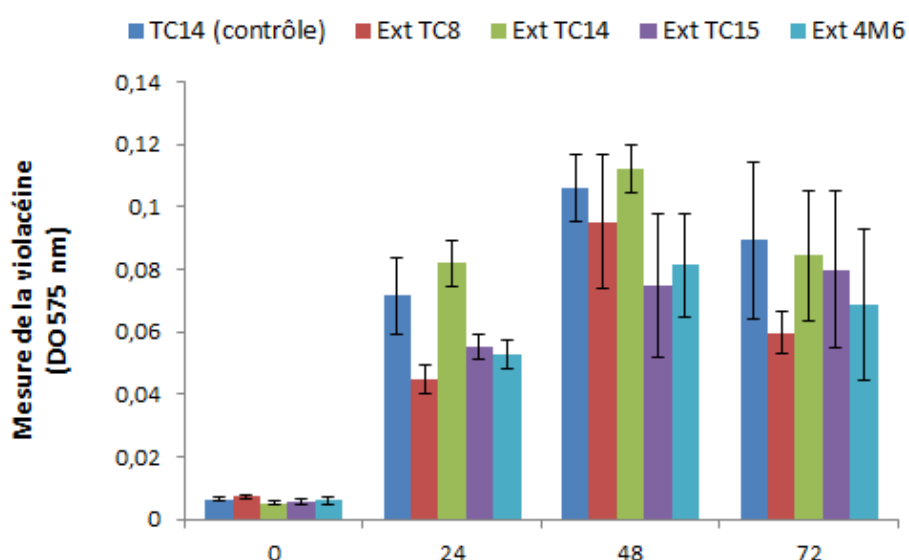


Figure 63 Effet des extraits de bactéries marines sur la production de violacéine par TC14. La violacéine a été mesurée à différents temps d'incubation (0, 24, 48 et 72h) et les résultats ont été comparés au contrôle (culture de TC14 sans extraits). Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicat.

Après 24, 48 et 72h de culture, il a été observé que les extraits de bactéries marines TC8, TC14, TC15 et 4M6 n'ont pas d'effet significatif sur la production de violacéine de TC14, même si des tendances semblent se dessiner avec par exemple une diminution de la production de violacéine à 48h et aux autres temps pour tous les extraits excepté celui de TC14. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de molécules venant interférer avec le QS de TC14, dans les extraits de bactéries autres que TC14. Les écarts-types sont énormes, notamment à 48 et à 72h ; l'étape d'extraction pouvant ajouter une variabilité supplémentaire dans les résultats, en comparaison avec l'utilisation de molécules commerciales standardisées.

L'inhibition du QS d'une bactérie par des extraits provenant d'autres bactéries a déjà été décrite dans la littérature. Musthafa *et al.* (2011) ont montré que l'extrait de la bactérie marine *Bacillus* sp. SS4 inhibait le QS de *C. violaceum* CV026 qui se traduisait par l'inhibition de la production de violacéine chez cette dernière. En 2010, Dheilly et collaborateurs ont montré que le surnageant de culture de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp.3J6 inhibait la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 qui est contrôlée par le QS. En dehors des bactéries, des extraits de champignons ont aussi été décrits comme inhibiteurs du QS des bactéries. C'est le cas de l'extrait du champignon *Tremella fuciformis* et de l'extrait du pigment du champignon *Auricularia auricula* qui inhibaient le QS de *C. violaceum* CV026 (Zhu & Sun, 2008 ; Zhu *et al.*, 2010). Afin de confirmer ou d'infirmer que les extraits de bactéries marines diminuent la production de violacéine de TC14, les bactéries vivantes ont été striées avec TC14 sur un milieu gélosé.

2.2 QSI sur gélose avec les bactéries marines

Cette expérience vient en complément de celle avec les extraits de bactéries à la différence que d'autres bactéries marines ont aussi été testées. Il s'agit de TC4, TC5, et TC9, qui font également parties des bactéries de la collection de Toulon, qui viennent donc s'ajouter à TC8, TC15, et 4M6. Les différentes bactéries marines ont été striées avec TC14 sur gélose VNSS, comme dans les cas des tests d'induction du QS sur gélose avec les biosenseurs CV026 et A136 ou d'inhibition du QS sur gélose avec le biosenseur *C. violaceum* 12472 (Rumbaugh *et al.*, 2011a). Les résultats du test d'inhibition de la production de violacéine de TC14 par les bactéries marines sur boîtes contenant du milieu VNSSA sont présentés dans la Figure 64.

Les résultats ont révélé que, inoculées avec TC14, les bactéries marines TC4, TC5 et TC9 semblent ne pas avoir d'impact sur la violacéine produite par TC14. En effet, l'intensité

de la coloration violette quand TC14 est striée seule sur boîte est similaire à celle observée lorsqu'elle est mise en présence des autres bactéries. Nous en avons déduit que les bactéries marines TC4, TC5 et TC9 semblent ne pas produire de molécules inhibitrices de la production de violacéine de TC14. En revanche, en présence des souches marines TC8, TC15 et 4M6, la coloration violette de TC14, caractéristique de la production de violacéine est légèrement réduite avec TC8, voire nettement réduite en présence de TC15 et de 4M6 (Figure 64). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus avec les extraits de ces mêmes bactéries.

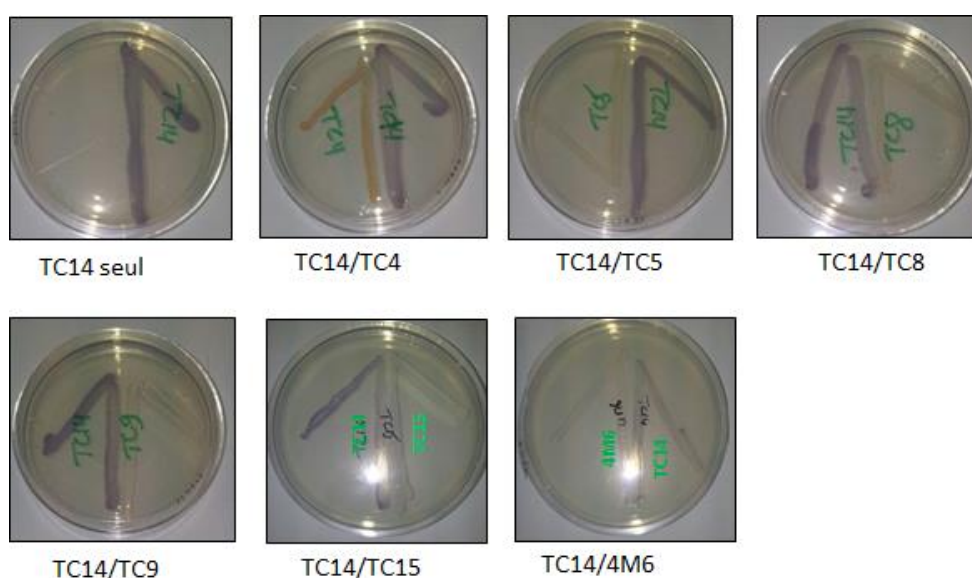


Figure 64 Essais d'inhibition du QS, réalisés en gélose entre TC14 et les bactéries marines. Stries croisées sur gélose VNSS entre TC14 et les bactéries marines TC4, TC5, TC8, TC9, TC15 et 4M6.

Pris ensemble, et compte tenu des résultats antérieurs qui avaient montré que les bactéries marines TC8 et 4M6 ne produisaient pas d'AHLs, ces résultats suggèrent que TC8, TC15 et 4M6 pourraient produire des molécules du QS qui ne sont pas des AHLs, mais qui pourraient jouer un rôle dans la diminution de la production de violacéine de TC14, sans impacter la croissance de celle-ci. En effet, en dehors des AHLs, des molécules du QS telles que l'AI-2 ont été identifiées chez certaines espèces du genre *Pseudoalteromonas* dont une souche de la même espèce que TC8, la souche *P. lipolytica* SCSIO 04301 (<http://img.jgi.doe.gov>). En plus de l'AI-2, des dicétopipérazines ont également été identifiées comme autoinducteurs potentiels du QS chez une souche du genre *Pseudoalteromonas*, la souche *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1, chez qui elles seraient à l'origine d'une activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* (Guo *et al.*, 2011). Quant à TC15, les résultats antérieurs ont montré qu'elle produirait la C₁₂-HSL qui a plutôt montré un léger effet agoniste

sur la production de violacéine de TC14. En se basant sur le présent résultat qui montre que striée avec TC14, TC15 diminue la production de violacéine de TC14, nous pourrions penser qu'en plus de la C₁₂-HSL, TC15 pourrait produire d'autres molécules capables d'interférer avec d'éventuels récepteurs du QS présents chez TC14, dont l'effet antagoniste sur la production de violacéine serait plus prononcé que le léger effet agoniste de la C₁₂-HSL. Par exemple, les dicétopipérazines ont été décrites comme des molécules inhibitrices du QS de *P. aeruginosa* (Holden *et al.*, 1999). Les bactéries marines peuvent donc produire des molécules du QS qui ne sont pas des AHLs, mais qui sont capables d'interférer avec le QS bactérien. Il pourrait s'agir de l'AI-2, des dicétopipérazines et des quinolones, bien que les quinolones ont été détectés à ce jour uniquement que chez *P. aeruginosa* (LaSarre & Federle, 2013).

3. Recherche de référence positive d'inhibition du QS chez TC14

La mise en place de bio-essais exige l'obtention de références à la fois positives et négatives. Dans le cas du bio-essai de l'inhibition du QS avec TC14, les expérimentations précédentes ont permis de déterminer une AHL comme référence positive d'inhibition. Il s'agit de la 3-oxo-C₆-HSL. Par ailleurs, les AHLs C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL et 3-oxo-C₁₂-HSL qui augmentent la production de la violacéine ont été considérées comme des références négatives d'inhibition du QS. Dans cette série d'expérimentations, nous nous sommes attelés à rechercher une deuxième référence positive pour les tests d'inhibition du QS avec TC14. Pour cela, une molécule, l'esculétine, préalablement décrite dans la littérature comme un inhibiteur du QS chez plusieurs bactéries, notamment *C. violaceum* CV026, *E. coli* JB523 et *P. aeruginosa* QSI2 (Brackman *et al.*, 2009 ; Zeng *et al.*, 2008) a été testée sur la croissance et sur la production de violacéine de TC14.

3.1. Effet de l'esculétine sur la croissance de TC14

Afin de s'assurer que l'esculétine soit testée sur la production de violacéine de TC14 à des concentrations non toxiques, une gamme de concentration d'esculétine allant de 50 à 500 µM a été testée sur la cinétique de croissance de TC14 en milieu VNSS (Voir Figure 65).

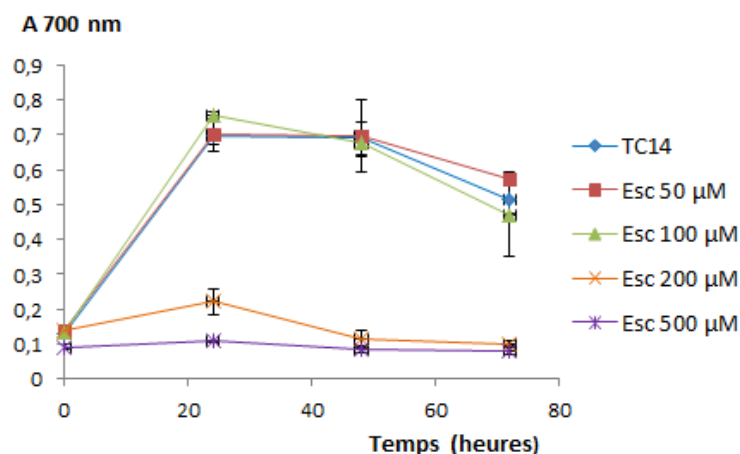


Figure 65 Effet de l'esculétine à différentes concentrations sur la croissance de TC14. Les expériences ont été réalisées en VNSS. La croissance a été suivie par la mesure de l'absorbance à 700 nm à différents temps de croissance. Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicats à partir de trois cultures différentes.

La Figure 65 montre que 200 µM et 500 µM d'esculétine inhibent totalement la croissance de TC14, et ce dès les premières heures d'incubation. Par contre, 50 µM et 100 µM n'affectent nullement la croissance de la bactérie jusqu'à 72h d'incubation. Dans la littérature, aucune étude n'a mentionné une activité antibactérienne de l'esculétine. En se basant sur les résultats de l'effet de l'esculétine sur la croissance de TC14, la concentration de 500 µM a été exclue pour la suite des tests. Par contre, la concentration de 200 µM a été retenue, afin de confirmer que l'inhibition de croissance entraîne bien celle de la production de violacéine.

3.2. Effet de l'esculétine sur la production de violacéine de TC14

L'esculétine a été testée aux concentrations finales de 50, 100 et 200 µM sur la production de violacéine de TC14 en milieu VNSS. Les résultats sont présentés dans la Figure 66.

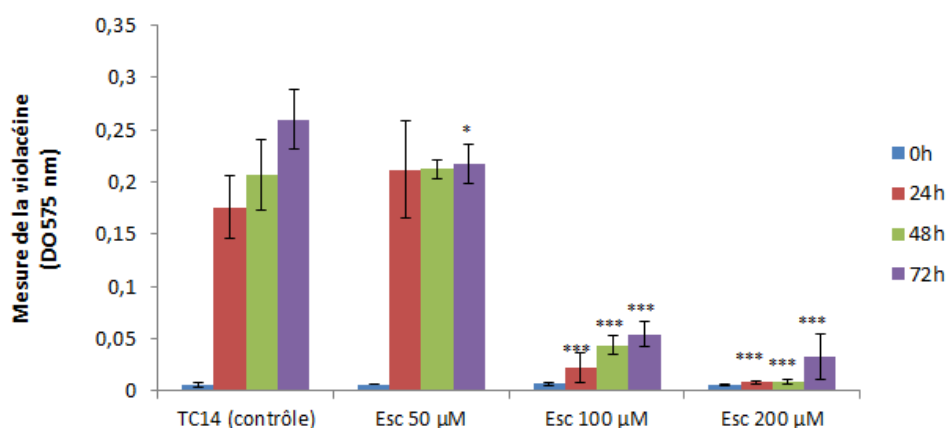


Figure 66 Effet de l'esculétine sur la production de violacéine de TC14.

La violacéine a été mesurée à différents temps d'incubation (0, 24, 48 et 72h) et les résultats ont été comparés au contrôle (culture de TC14 sans esculétine). Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicat. Les conditions marquées d'astérisques sont significativement différentes du contrôle) (Bonferroni; ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$).

La Figure 66 montre que 50 μM d'esculétine n'affectent pas la production de violacéine de TC14 à 24h et à 48h d'incubation. A partir de 72h d'incubation, la production de violacéine diminue de manière significative ($p < 0,05$). En revanche, 100 μM d'esculétine bloquent la production de violacéine de TC14 tout comme 200 μM . L'effet de l'esculétine à 200 μM sur la production de violacéine n'est pas surprenant, puisqu'à cette concentration l'esculétine semble affecter la croissance bactérienne. A 100 μM , l'esculétine expose un effet purement inhibiteur sur la production de violacéine, puisqu'il n'y a aucun effet observé sur la croissance. Dans les travaux de Brackman et collaborateurs en 2009, l'esculétine inhibe la production de violacéine de *C. violaceum* CV026 de 55% à partir de 500 μM . En comparant l'effet de l'esculétine dans les deux travaux, il ressort que l'esculétine semble être plus active chez TC14 (environ 90% d'inhibition à 100 μM) que chez CV026 (environ 55% d'inhibition à 500 μM) à 48h de culture. Selon Brackman *et al.* en 2009, le mécanisme de l'inhibition du QS par l'esculétine chez CV026 n'est pas complètement élucidé. Les auteurs ont suggéré que l'inhibition du QS bactérien par des molécules exogènes de tout type qu'elles soient pourrait être majoritairement due d'une part, au fait que les molécules peuvent réduire l'expression de l'homologue du gène *luxI* pour les bactéries qui en possèdent et d'autre part, les molécules inhibitrices du QS bactérien peuvent avoir une spécificité pour l'un des récepteurs du QS présents chez chaque bactérie (Brackman *et al.*, 2009). En se basant sur leur suggestion, nous pouvons avancer que l'esculétine pourrait avoir une spécificité pour les récepteurs de plusieurs bactéries à la fois comme par exemple *C. violaceum* CV026, *E. coli* JB523 et *P.*

aeruginosa QSI2, mais aussi pour l'éventuel récepteur du QS présent chez TC14, car elle inhibe le QS de chacune de ces bactéries. A propos de TC14, l'inhibition du QS par l'esculétine n'est vraisemblablement pas liée à l'inhibition de l'activité d'un homologue de *luxI*, puisque les résultats antérieurs ont montré que TC14 ne produit pas d'AHLs intrinsèques, donc ne posséderait pas d'homologue *luxI* fonctionnel. Etant donné que TC14 est capable de répondre à des AHLs exogènes alors qu'elle n'en produit pas, il est possible qu'elle possède un circuit QS incomplet (Case *et al.*, 2008) comportant uniquement un récepteur de type LuxR dont l'activité peut être soit augmentée, soit réduite ou totalement inhibée en présence de certaines molécules exogènes. Parmi les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* dont fait partie TC14, il existe des souches qui possèdent un circuit QS incomplet avec la présence d'un homologue de *luxR* seulement (<http://img.jgi.doe.gov>). Il ne peut être exclure que 100 μ M d'esculétine bloquent totalement le mécanisme de la production de violacéine par un mécanisme qui reste à ce jour inconnu chez TC14. A 50 μ M d'esculétine, une réduction tardive dans la production de violacéine est observée. Cette réduction tardive à 72h d'incubation pourrait s'expliquer par le contact prolongé de la bactérie avec l'esculétine.

Une autre molécule qui a aussi montré un effet antagoniste sur la production de violacéine est la 3-oxo-C₆-HSL. Elle est d'ailleurs la seule AHL à avoir inhibé la production de violacéine de TC14 à 50 μ M sans en effet toxique. Son effet inhibiteur sur la production de violacéine a été comparé à celui de l'esculétine. Les résultats sont présentés sur la Figure 67.

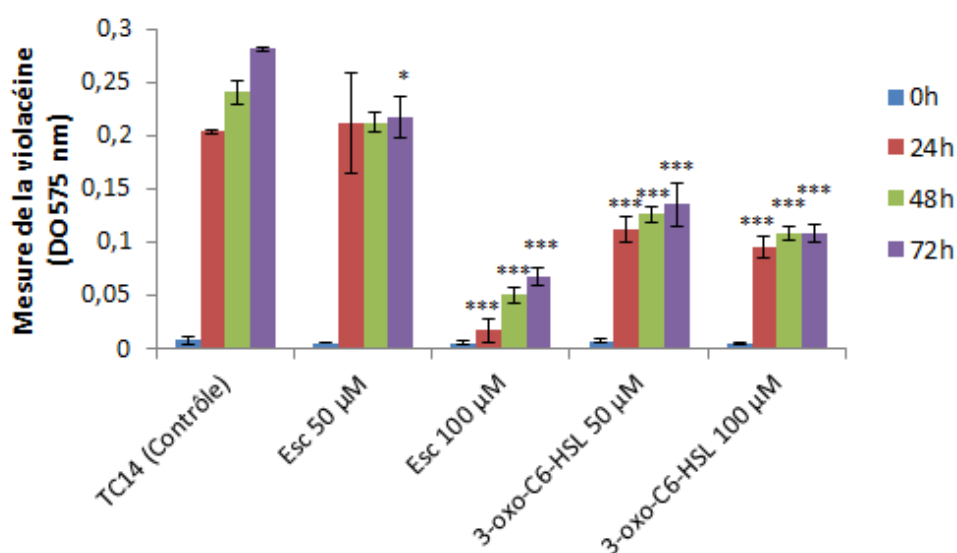


Figure 67 Comparaison de l'effet inhibiteur de la 3-oxo-C₆-HSL et de l'esculétine. Pour chaque condition (molécules testées et concentrations), la violacéine a été mesurée et comparée au contrôle (culture de TC14 sans molécules).

La Figure 67 montre que la 3-oxo-C₆-HSL et l'esculétine inhibent de façon significative la production de violacéine de TC14. L'activité de la 3-oxo-C₆-HSL a été comparée à celle de l'esculétine à 50 µM et à 100 µM. A 100 µM, après 24h d'incubation, l'esculétine inhibe presque totalement la production de violacéine, alors que la 3-oxo-C₆-HSL la diminue seulement de moitié. Par contre à 50 µM, la 3-oxo-C₆-HSL réduit toujours de moitié la production de violacéine, alors que l'esculétine ne montre qu'un léger effet inhibiteur sur la production de violacéine après 72h d'incubation (Figures 67). En comparant l'effet de la 3-oxo-C₆-HSL à 50 et à 100 µM, il ressort qu'il n'y a pas de différence significative entre la quantité de violacéine produite en présence de 50 µM et de 100 µM de la 3-oxo-C₆-HSL. L'effet seuil d'inhibition pourrait déjà être atteint à partir de 50 µM. De plus, la 3-oxo-C₆-HSL montre un effet significatif à 50 µM, et ce dès 24h, alors que l'esculétine n'induit une inhibition de la production de violacéine au même temps qu'à 100 µM. Par conséquent, il semblerait qu'à 50 µM, la 3-oxo-C₆-HSL agirait plus rapidement et donc plus efficacement sur les cellules bactériennes que l'esculétine. La littérature a déjà fait cas d'AHLs qui inhibent le QS bactérien basé sur la production de violacéine. McLean *et al.* (2004) ont montré que les AHLs natives de *P. aeruginosa*, notamment la C₄-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL inhibaient la violacéine produite par *C. violaceum* 12472. De plus, des homologues structurelles d'AHLs telles que les furanones halogénées ont été décrites comme étant des inhibiteurs du QS de *C. violaceum* CV026 (Martinelli *et al.*, 2004).

Il ressort de l'étude sur la recherche de références positives pour le test d'inhibition du QS de TC14, qu'en plus de la 3-oxo-C₆-HSL à 50 µM, l'esculétine a montré un effet inhibiteur sur le QS de TC14 à 100 µM. Les deux molécules ont donc été considérées comme des références positives d'inhibition de la production de violacéine de TC14 aux concentrations de 50 µM pour la 3-oxo-C₆-HSL et de 100 µM pour l'esculétine. Puisque l'approvisionnement en 3-oxo-C₆-HSL est plus difficile que celle de l'esculétine en termes de quantité et de coût, l'esculétine a finalement été la seule référence positive d'inhibition du QS à être utilisée pour la suite des tests.

3.3. Effet antagoniste des AHLs exogènes induisant la production de la violacéine et de l'esculétine

Ayant identifié d'une part des molécules agonistes de la production de violacéine (C_6 -HSL, 3-oxo- C_8 -HSL et 3-oxo- C_{12} -HSL) et d'autre part des molécules antagonistes (la 3-oxo- C_6 -HSL et l'esculétine), il a été intéressant de vérifier s'il pourrait exister un effet de compétition entre les deux types de molécules qui influencent la production de violacéine chez TC14. Pour cela, TC14 a été mise en culture en VNSS en présence de l'esculétine utilisée comme inhibiteur, et des AHLs exogènes utilisées comme activateurs. Les résultats sont présentés dans la Figure 68.

Il est observé que la production de violacéine, inhibée par 100 μ M d'esculétine est améliorée en présence de deux des trois AHLs exogènes activatrices de la production de violacéine (3-oxo- C_{12} -HSL et 3-oxo- C_8 -HSL), à 25 et à 50 μ M (Figure 68b). Par exemple, après 72h d'incubation, la production de violacéine inhibée par 100 μ M d'esculétine augmente de $DO_{575nm} = 0,05$ à $DO_{575nm} = 0,15$ en présence de la 3-oxo- C_{12} -HSL à 25 μ M. C'est aussi le cas de la 3-oxo- C_8 -HS qui à 50 μ M fait remonter la production de violacéine de $DO_{575nm} = 0,05$ à $DO_{575nm} = 0,1$ en présence de l'esculétine. La troisième AHL exogène, la C_6 -HSL n'améliore pas la production de violacéine à 25 ni à 50 μ M en présence de l'esculétine.

En comparant l'activité de la 3-oxo- C_{12} -HSL et celle de la 3-oxo- C_8 -HSL, il ressort clairement que, dans les mêmes concentrations, la 3-oxo- C_{12} -HSL possède un effet activateur plus prononcé sur la production de violacéine que la 3-oxo- C_8 -HSL en présence de l'inhibiteur.

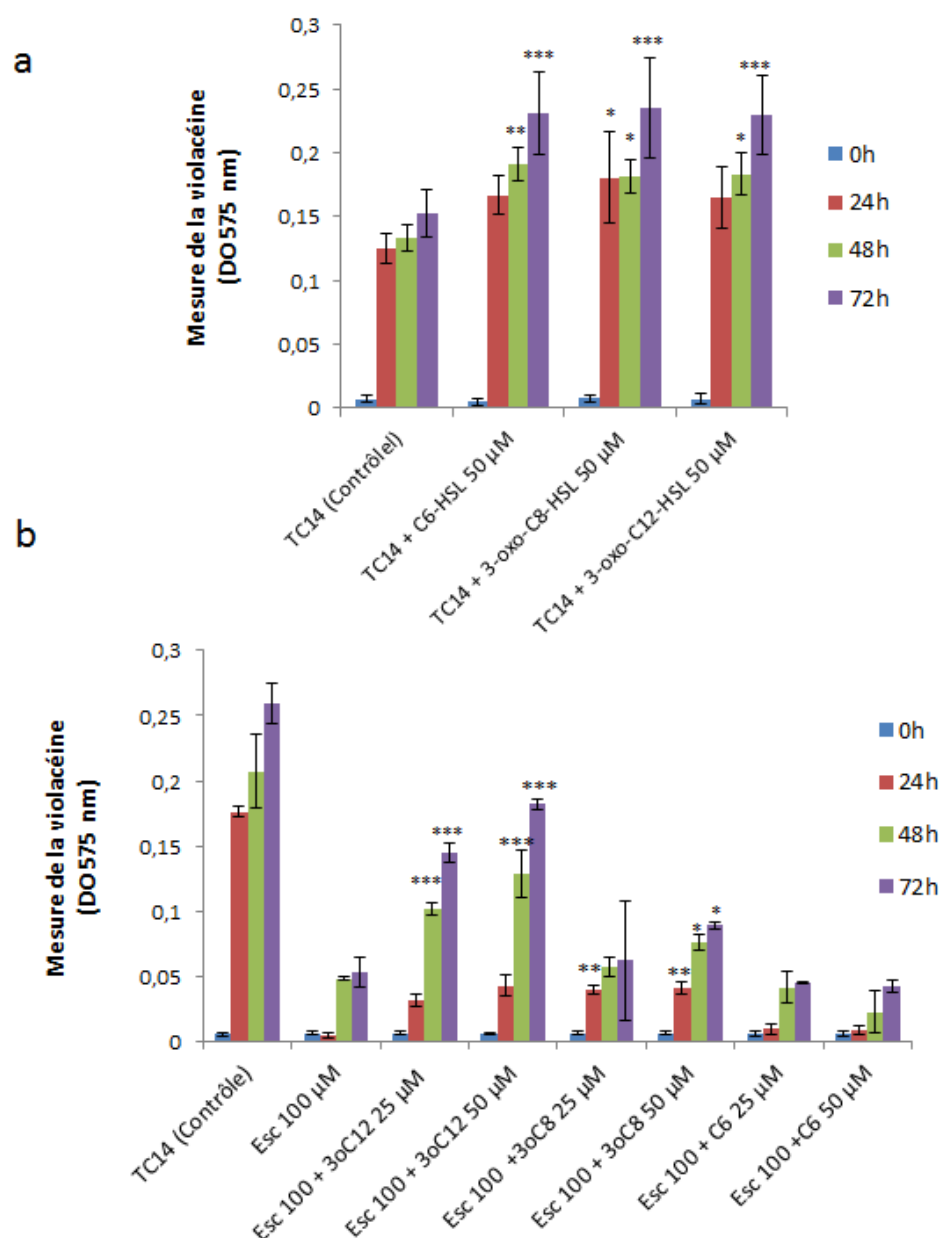


Figure 68 Effet de compétition entre inhibiteurs et activateurs du QS chez TC14.

(a) Effet agoniste des AHLs exogènes C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL et 3-oxo-C₁₂-HSL à 50 µM sur la production de violacéine de TC14.

(b) Effet de compensation de certaines des AHLs en présence de 100 µM d'esculétine. Les différentes conditions ont été comparées à celle de l'esculétine à 100 µM seule. Les conditions marquées d'astérisques se sont avérées significativement différents de l'esculétine à 100 µM (Bonferroni; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Ces résultats amènent à penser qu'il pourrait exister un effet de compétition entre l'esculétine et deux AHLs, notamment la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL. Dans la littérature, il existe des systèmes de compétitions entre des activateurs et des inhibiteurs du QS bactérien. Selon certains auteurs, de façon générale dans le cadre du QS, il peut s'établir une compétition entre deux molécules pour le site d'un récepteur du QS. L'exemple le plus

connu d'inhibition du QS par compétition est celui qui existe entre la furanone halogénée et plusieurs molécules d'AHLs telles que la 3-oxo-C₆-HSL, la C₄-HSL, la C₆-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL respectivement pour les récepteurs du QS LuxR, SwrR, CviR et LasR (Hentzer *et al.*, 2002 ; Manefield *et al.*, 1999 ; Martinelli *et al.*, 2004 ; Rasmussen *et al.*, 2000). Outre la furanone, la C₁₀-HSL a été décrite comme un compétiteur de la C₆-HSL pour le récepteur CviR de *C. violaceum* CV026 (McClean *et al.*, 1997). McLean et collaborateurs en 2004 ont suggéré que dans un système d'inhibition du QS, une augmentation dans la concentration de l'autoinducteur, soit de l'activateur, pourrait bloquer l'effet de l'inhibiteur. Selon ces auteurs, dans les bio-essais d'inhibition du QS impliquant *C. violaceum* 12472, une concentration excessive de la bactérie générerait une concentration suffisante de la C₆-HSL pouvant bloquer l'effet de toute molécule inhibitrice. En se basant sur la suggestion de ces auteurs, nous pourrions penser qu'une augmentation de la concentration de la 3-oxo-C₈-HSL ou de la 3-oxo-C₁₂-HSL pourrait bloquer l'effet inhibiteur de l'esculétine et restaurer totalement la production de violacéine. Un autre exemple est la présumée compétition entre la 3-oxo-C₈-HSL et plusieurs analogues AHLs (3-oxo-hexanoyl-HSL, heptanoyl-HSL, octanoyl-HSL, decanoyl-HSL, 3-hydroxynonanoyl-HSL, 3-hydroxydodecanoyl-HSL, 2-octenoyl-HSL, nonenoyl-HSL) pour le récepteur TraR d'*A. tumefaciens*, décrite par Zhu *et al.* (1998). Aussi, plusieurs molécules naturelles et synthétiques ont été citées dans la littérature comme étant des compétiteurs potentiels d'une variété de signaux naturels impliqués dans les systèmes QS de plusieurs bactéries (Dobretsov *et al.*, 2009; Kalia, 2013). Toutefois concernant TC14, l'effet de compétition entre l'esculétine et les AHLs citées plus haut reste à démontrer d'un point de vue mécanistique puisque le mécanisme d'inhibition de la production de violacéine par l'esculétine n'a pas encore été clairement élucidé. D'autre part, la Figure 68 montre que parmi les AHLs agonistes de la production de violacéine, la C₆-HSL ne parvient pas à rehausser la quantité de violacéine inhibée par l'esculétine contrairement à la 3-oxo-C₁₂-HSL et la 3-oxo-C₈-HSL. Cela pourrait être dû au fait que le supposé récepteur de TC14 aurait moins d'affinité pour la C₆-HSL par rapport aux deux autres AHLs ou encore, que l'effet de l'esculétine prend le dessus et masque totalement celui de la C₆-HSL. Il semble également que le potentiel récepteur de TC14 pourrait avoir plus d'affinité pour la 3-oxo-C₁₂-HSL que pour la 3-oxo-C₈-HSL. En effet, les récepteurs du QS ne possèdent pas le même degré d'affinité pour toutes les molécules du QS (Waters & Bassler, 2005). Par exemple, chez *A. tumefaciens*, TraR répond à plusieurs AHLs dont la 3-oxo-C₈-HSL, la C₆-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL mais a plus d'affinité pour la 3-oxo-C₈-HSL que pour les autres AHLs (Zhu *et al.*, 1998).

3.4. Effet de l'esculétine sur la mobilité de TC14

L'esculétine est une molécule qui a montré un effet inhibiteur très intéressant sur la production de violacéine de TC14. De ce fait, il a paru intéressant de vérifier son effet sur d'autres phénotypes de TC14 tel que la motilité par swimming et par swarming. Dans cette expérience, l'esculétine a été testée à 50 et à 100 μM sur le swimming et le swarming de TC14 en milieu VNSS. Les résultats sont présentés dans la Figure 69.

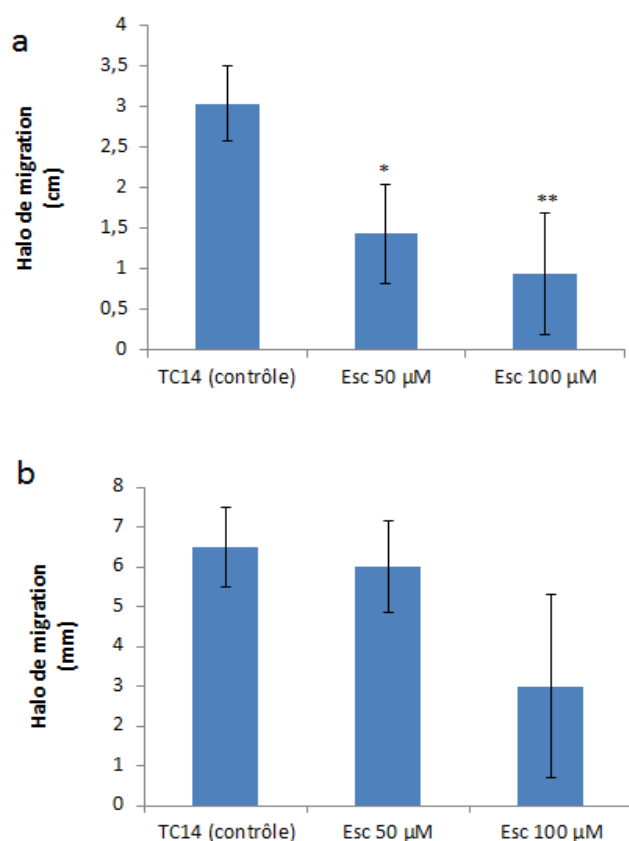


Figure 69 Effet de l'esculétine sur la mobilité de TC14.

L'esculétine a été testée à 50 et à 100 μM sur (a) le swimming (b) le swarming de TC14 en gélose VNSS. Chaque essai a été réalisé en triplicats. Les essais marqués par des astérisques sont significativement différents ($p < 0,05$) au contrôle (culture de TC14 sans esculétine).

L'esculétine semble avoir une activité très intéressante sur la mobilité par swimming de TC14. En effet, elle réduit significativement le swimming de TC14, et ce de façon dépendante de la concentration (Figure 69a). Cette activité inhibitrice n'a cependant pas été observée sur le swarming de la bactérie. En effet, la Figure 69 montre que l'esculétine n'a pas d'effet sur le swarming de TC14 à 50 μM . En revanche, à 100 μM d'esculétine, une diminution du swarming est observée, mais elle n'est pas significative.

Tout comme les AHLs exogènes à 50 μM , l'esculétine inhibe le swimming et non le swarming de TC14. Dans la littérature, à notre connaissance, aucune étude n'a décrit un éventuel effet inhibiteur de l'esculétine sur la mobilité bactérienne. L'esculétine a plutôt été décrite comme une molécule inhibitrice du QS relatif à la production de violacéine et à la formation de biofilm (Brackman *et al.*, 2009).

3.5. Effet de l'esculétine sur la formation de biofilm de TC14

L'esculétine a aussi été testée sur la formation de biofilm de TC14. Le test du BFRT a été utilisé pour cette expérimentation. Les concentrations d'esculétine testées ont été 50 et 100 μM puisque l'esculétine s'est avérée toxique à 200 μM . Les expérimentations n'ayant été réalisées qu'une fois, il est question ici de résultats préliminaires. Les résultats préliminaires sont donc présentés par la Figure 70.

En observant la Figure 70, il ressort comme dans les résultats précédents que la bactérie ne forme pas de biofilm avant 48h d'incubation. Après 48h d'incubation, 100 μM d'esculétine induisent une diminution du biofilm (le ΔBFI passe de 15 à 13), cependant aucun effet n'est observé à 50 μM . Après 72h d'incubation, la diminution du biofilm s'accroît à 100 μM d'esculétine (le ΔBFI passe de 17 à 10). Ces résultats étant préliminaires, d'autres essais doivent être effectués afin de les confirmer.

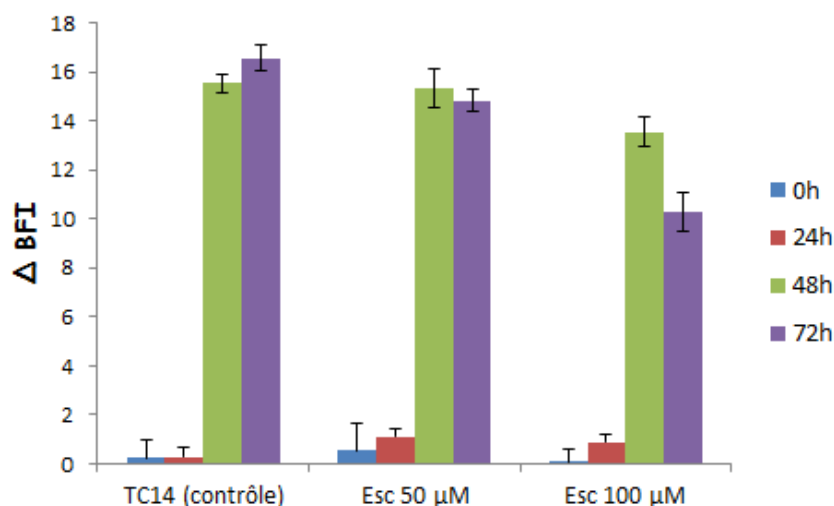


Figure 70 Effet de l'esculétine sur la formation de biofilm de TC14.

L'esculétine a été testée à 50 et à 100 μM sur une culture de TC14 en MB. L'indice de formation de biofilm a été mesuré pour chaque essai et le ΔBFI {(BFI du milieu seul avec ou sans esculetine) - (BFI de la culture de TC14 avec ou sans esculetine)} a été calculé à partir du logiciel BioFilm Control. Cette expérience a été réalisée une fois en triplicat, il s'agit donc de résultats préliminaires.

L'esculétine a été décrite dans des travaux précédents comme étant inhibiteur des biofilms bactériens, particulièrement chez le genre *Burkholderia*. En effet, dans les travaux réalisés par Brackman et collaborateurs en 2009, 500 μM d'esculétine inhibent la biomasse du biofilm des souches *Burkholderia multivorans* LMG13010, *B. multivorans* LMG17588 de 25% et le biofilm de *B. cenocepacia* LMG18828 de 10%. La formation de biofilm chez les souches du genre *Burkholderia* étant très souvent sous la régulation du QS (Eberl, 2006), son inhibition par l'esculétine serait due à une inhibition directe du QS chez ces bactéries. Une autre étude réalisée par Zeng *et al.* en 2008, a révélé que 200 μM d'esculétine, une concentration se rapprochant de celle utilisée dans notre étude, inhibent la formation de biofilm de *P. aeruginosa* (Zeng *et al.*, 2008). L'effet antibiofilm de l'esculétine chez TC14 semble être similaire à celui de la 3-oxo-C₆-HSL précédemment décrit. Ainsi, la 3-oxo-C₆-HSL et l'esculétine inhiberaient non seulement le biofilm de TC14, mais aussi la production de violacéine par la bactérie.

3.6. Effet de l'esculétine sur l'adhésion de TC14

L'esculétine ayant montré un effet inhibiteur sur le biofilm de TC14, son effet a été également testé sur l'adhésion de TC14 (Voir Figure 71). Il est à noter sur la Figure 71 que l'esculétine n'a pas d'effet significatif sur l'adhésion de TC14, même à des concentrations aussi élevées que 100 μM . L'adhésion est une étape préliminaire dans la formation de biofilm qui débute dès les premières minutes de contact entre la bactérie et la surface. Dans notre étude, elle a été évaluée après 24h d'incubation, similairement aux travaux effectués par Camps *et al.* en 2011 en présence de différentes concentrations d'esculétine. La Figure 70 montre que jusqu'à 48h d'incubation, l'esculétine n'a pas d'effet sur le biofilm, ce qui pourrait expliquer le fait qu'il n'y ait pas d'effet sur l'adhésion qui se produit généralement entre 0 et 24h. Nous retenons que l'esculétine à 100 μM (concentration non toxique pour TC14) n'a pas d'effet sur l'adhésion bactérienne (avant 24h d'incubation), mais sur le biofilm formé (après 48h d'incubation). Ce résultat va dans le même sens que celui de Brackman et collaborateurs en 2009 dans lequel un inhibiteur synthétique du QS, le N'-(6-tert-butyl-2,3-dihydro-2-methylpyridazin-4-yl)-5-chorothiophene-2-carbohydrazide (composé 3) à 500 μM n'affecte pas l'adhésion de *B. cenocepacia* LMG16656 qui se produit dès 4h après la mise en culture mais affecte plutôt le biofilm formé après 24h de culture.

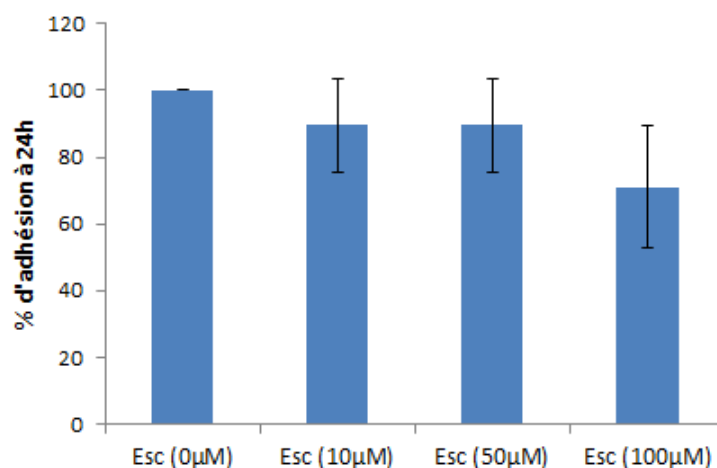


Figure 71 Effet de l'esculétine sur l'adhésion de TC14.

L'esculétine a été testée à 10, 50 et à 100 µM sur une culture de TC14 en ASW après 24h d'incubation en microplaque. Les résultats sont présentés en pourcentage d'adhésion. Les essais (culture de TC14 en présence des différentes concentrations d'esculétine) ne se sont pas avérés significativement différents comparés au contrôle (culture de TC14 sans esculétine), (Esc 0 µM) ($p > 0,05$). Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicat.

La recherche de contrôles positifs pour la réalisation des tests d'inhibition du QS avec TC14 a conduit à l'identification de la 3-oxo-C₆-HSL et de l'esculétine. Ces deux molécules ont montré chacune un effet inhibiteur intéressant sur la production de violacéine et la formation de biofilm de TC14 à 100 µM ainsi que sur le swimming à 50 µM. Le phénotype visible et facilement quantifiable qu'est la production de violacéine a été choisi pour réaliser les tests d'inhibition du QS avec TC14, comme dans le cas de *C. violaceum* 12472 (McLean *et al.*, 2004).

4. Tests d'inhibition du QS de *C. violaceum* et de TC14

L'interférence avec le QS bactérien représente de nos jours une stratégie en développement qui pourrait s'avérer être efficace dans la lutte contre les infections et les biofilms bactériens (Dobretsov *et al.*, 2011; Musk Jr & Hergenrother, 2006). En milieu marin, peu de stratégies sont à l'étude pour lutter contre le biofilm voire le biofouling, de manière respectueuse de l'environnement et le QS en fait partie (Dobretsov *et al.*, 2009 ; Dobretsov *et al.*, 2013). Dans cette étude, il s'agit d'identifier des molécules non toxiques pouvant s'intégrer à un revêtement (greffage, relargage contrôlé...), capables d'interférer avec le QS de bactéries en milieu marin et ainsi d'inhiber les biofilms marins et ultérieurement le biofouling qui se développe sur de surfaces immergées telles que les coques de bateaux. Les tests QSIs impliquent systématiquement l'utilisation de biosenseurs avec un système

rapporteur du QS naturel ou de biosenseurs génétiquement modifiés. Les biosenseurs très souvent utilisés dans les tests QSIs appartiennent à l'espèce *C. violaceum* avec la souche CV026 (Martinelli *et al.*, 2004 ; Teasdale *et al.*, 2009), CV017 (Dobretsov *et al.*, 2010 ; Dobretsov *et al.*, 2011) et 12472 (Burt *et al.*, 2014; McLean *et al.*, 2004). Il peut également s'agir de l'espèce *E. coli* avec les souches JM109 (Holden *et al.*, 1999 ; Rajamani *et al.*, 2008), JB525 (Teasdale *et al.*, 2009), MT102 (Manefield *et al.*, 1999), de l'espèce *A. tumefaciens* avec la souche WCF47 (Geske *et al.*, 2005) pour ne citer que ceux-là.

Dans cette étude, TC14 a été choisi comme un outil de test d'origine marine et *C. violaceum* 12472 a été utilisé comme un biosenseur de référence pour l'inhibition du QS parmi tous les biosenseurs cités ci-dessus. Les deux biosenseurs possèdent un même phénotype visible, facilement détectable et quantifiable qui est la production de violacéine. Ainsi, des molécules commerciales et des analogues synthétiques ont été testés à différentes concentrations, en fonction de chaque molécule sur la production de violacéine des deux souches.

4.1. Tests QSI avec des composés commerciaux

Quatre composés commerciaux ont été testés sur la croissance et le QS des deux biosenseurs. Il s'agit de l'esculétine (déjà testé chez TC14), de la *p*-benzoquinone (Brackman *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2005), du carvacrol (Burt *et al.*, 2014) et de l'acide kojique (Dobretsov *et al.*, 2011). Ces molécules ont toutes été décrites dans la littérature comme étant des molécules inhibitrices du QS chez plusieurs bactéries. Les dénominations ben, Car et AK ont été données respectivement pour la *p*-benzoquinone, le carvacrol et l'acide kojique. Les concentrations des molécules utilisées dans cette étude ont été choisies en fonction de leur activité inhibitrice décrite dans la littérature, d'où les variations en fonction des molécules.

4.1.1. Sur le QS de *C. violaceum* 12472

Avant tout essai d'inhibition du QS, les molécules sont au préalable testées sur la croissance du biosenseur qui sert à réaliser le test afin de vérifier si elles ne possèdent pas d'activité bactéricide aux concentrations testées. L'esculétine a été testée sur le QS de *C. violaceum* 12472 à 50, 100 et 200 μ M, la *p*-benzoquinone à 10, 50 et 100 μ M, l'acide kojique et le carvacrol à 100, 200 et 500 μ M. Les résultats de l'effet des molécules commerciales sur la croissance de 12472 sont présentés par la Figure 72.

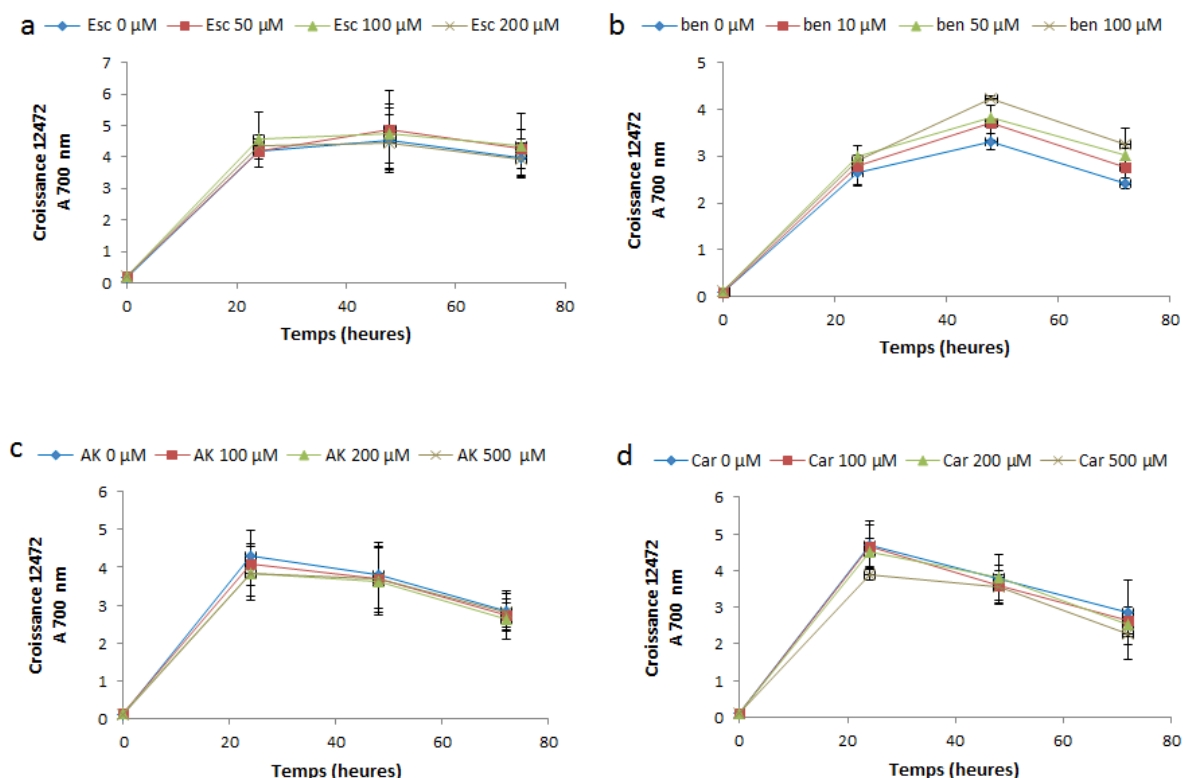


Figure 72 Effet des molécules commerciales sur la croissance de 12472.

(a) esculetine (b) *p*-benzoquinone (c) acide kojique (d) carvacrol. Chaque expérience a été réalisée trois fois. Le contrôle correspond à la souche sans molécules ajoutées (0 µM).

Aucune des quatre molécules testées n'affecte la croissance de la souche 12472 aux concentrations indiquées à 24h, ni à 48h et 72h. Ne s'étant pas montrées toxiques, les molécules commerciales ont donc été testées sur la production de violacéine de 12472 qui est régulée par le QS. Les résultats de l'effet des molécules commerciales à différentes concentrations sur le QS de 12472 sont présentés par la Figure 73.

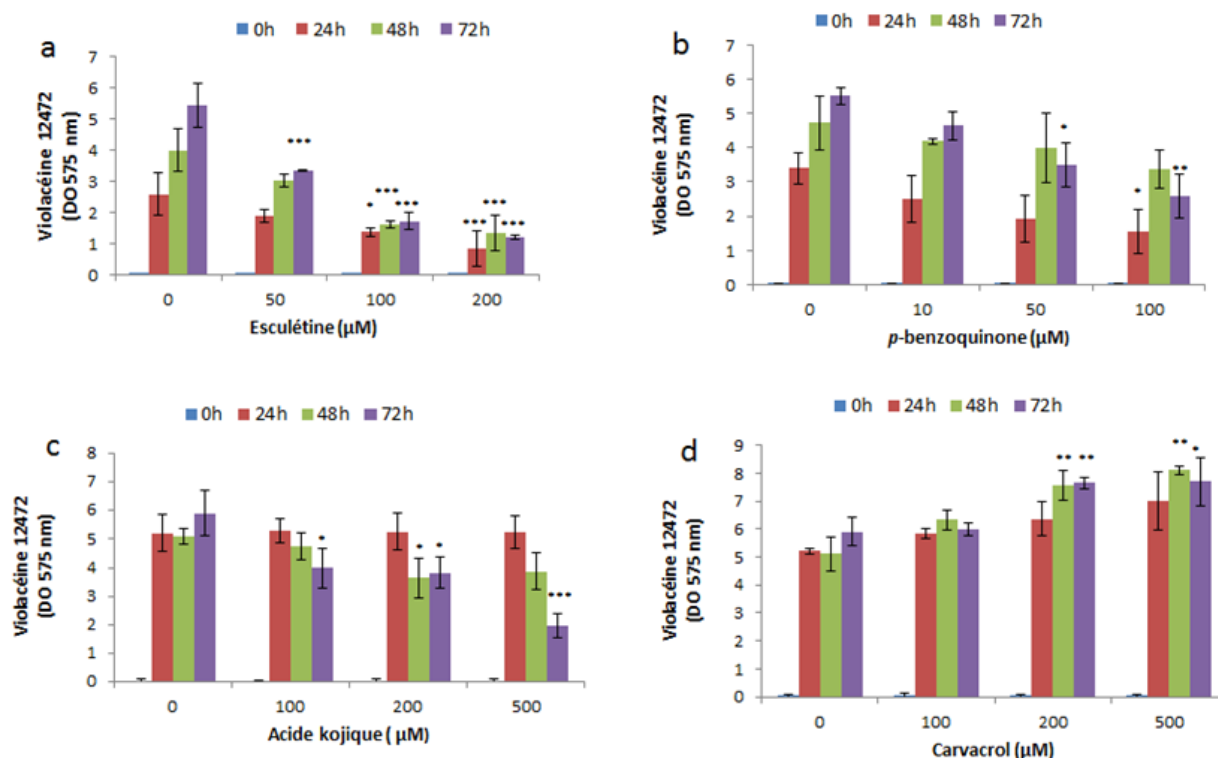


Figure 73 Effet des molécules commerciales sur le QS de 12472.

(a) esculétine (b) *p*-benzoquinone (c) acide kojique (d) carvacrol. Pour chaque molécule, les essais marqués d'astérisques sont significativement différents du témoin, culture de 12472 sans ajout de molécules (0 μM) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$). Chaque expérience a été réalisée trois fois.

Les résultats montrent que trois des quatre composés testés inhibent le QS de *C. violaceum* 12472. Il s'agit de l'esculétine, de la *p*-benzoquinone et de l'acide kojique. L'esculétine affiche un effet inhibiteur très intéressant. En effet, 50 μM d'esculétine entraînent l'inhibition du QS de 12472 à plus de 60% à 72h d'incubation. L'inhibition semble être plus intense à des concentrations plus élevées d'esculétine. Par exemple, à 100 μM d'esculétine, le QS est inhibé de 50% à 24h et de 80% à 72h (Figure 73a). Quant à la *p*-benzoquinone, elle inhibe un peu moins le QS de 12472 avec à peu près 50% d'inhibition à partir de 72h de culture (Figure 73b). Pour ce qui est de l'acide kojique, il inhibe le QS de 12472 de 30% à partir de 100 μM avec une activité plus intense (67%) à 500 μM (Figure 73c). D'une façon générale, il faut noter pour les molécules qui ont montré une activité anti-QS chez 12472, que l'effet inhibiteur est plus élevé à 72h d'incubation. Ce résultat semble aller dans le même sens que celui de la régulation de la production de violacéine de TC14 par des molécules exogènes du QS, qui est plus accentuée à 72h. En revanche, la quatrième molécule, le carvacrol semble avoir un effet plutôt activateur sur le QS de 12472 à partir de 200 μM (Figure 73d). Ce résultat est contraire à ceux de Burt et collaborateurs (2014) qui ont

montré que le carvacrol inhibait la production de violacéine, donc le QS de *C. violaceum* 12472, aux concentrations allant de 100 à 400 μM . Les raisons de cette différence ne sont pas connues mais pourraient s'expliquer par des différences dans les conditions de culture telles que la température, bien que cela soit peu probable.

L'esculétine, la *p*-benzoquinone et l'acide kojique ont déjà été décrits comme des inhibiteurs du QS chez diverses bactéries. Ainsi, l'esculétine a montré un effet anti-QS chez plusieurs souches notamment *C. violaceum* CV026 (55% d'inhibition à 500 μM), *E. coli* JB523 (50% d'inhibition à 500 μM) et *P. aeruginosa* QSI52 (67% d'inhibition à 500 μM) à 48h d'incubation (Brackman *et al.*, 2009). Pour ce qui est de la *p*-benzoquinone, elle inhibe le QS d'*E. coli* avec 42% d'inhibition à 20 μM . Enfin, Dobretsov et collaborateurs (2011) ont montré que l'acide kojique inhibe la formation du microfouling entre 330 μM et 1 mM

4.1.2. Sur le QS de TC14

Les mêmes molécules commerciales ont été testées aux mêmes concentrations sur la croissance et la production de violacéine de TC14 (Voir Figures 74 et 75).

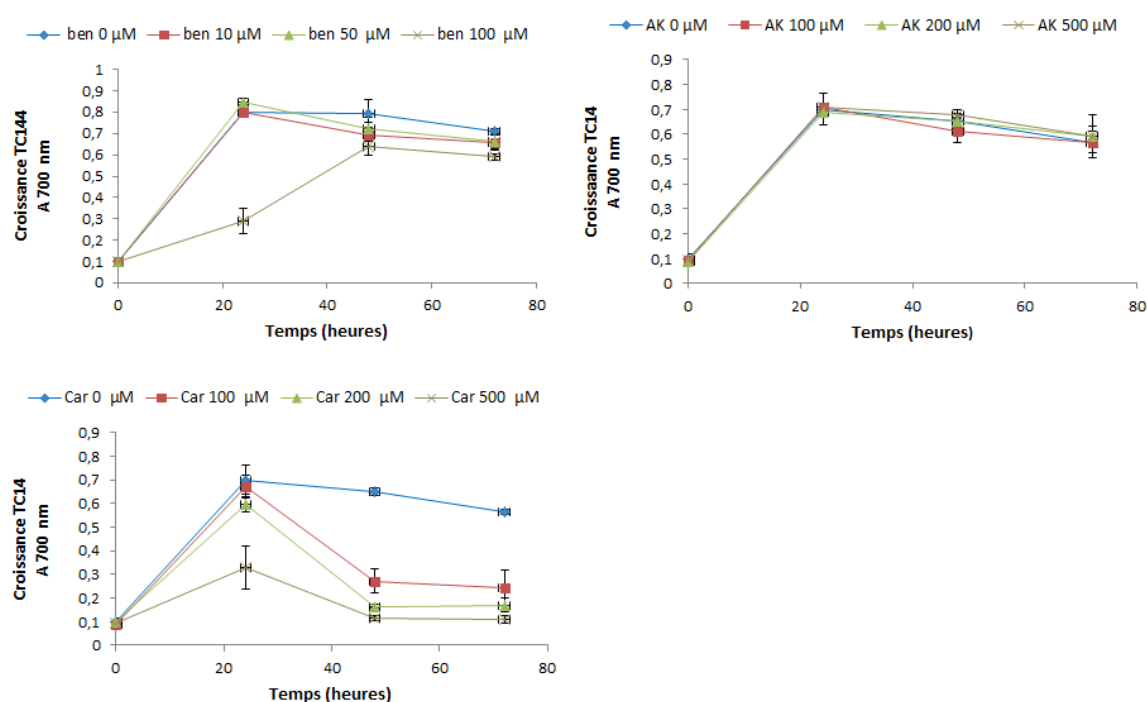


Figure 74 Effet des molécules commerciales sur la croissance de TC14.
(a) *p*-benzoquinone (b) acide kojique (c) carvacrol. Les expériences ont été réalisées trois fois.

La Figure 74 montre que les molécules testées n'affectent pas la croissance de TC14 à l'exception du carvacrol qui inhibe significativement la croissance bactérienne à partir de 48h de culture, à toutes les concentrations testées (Figure 74c). Le carvacrol s'étant montré toxique pour TC14 il n'a pas été testé sur la production de violacéine de celle-ci. (Figure 75).

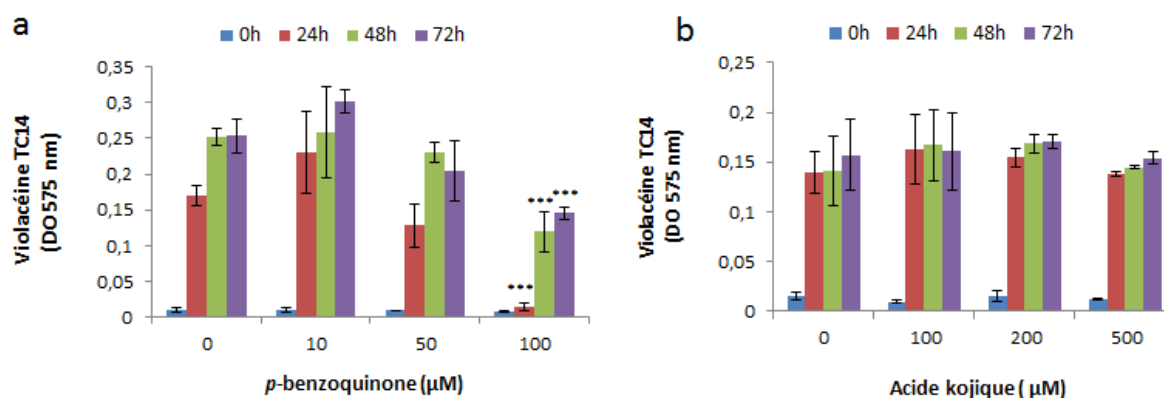


Figure 75 Effet des molécules commerciales sur la production de violacéine de TC14. (a) *p*-benzoquinone (b) acide kojique. Les essais marqués d'astérisques sont significativement différents (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$) par rapport aux contrôles (culture de TC14 sans ajout de molécules). Les expériences ont été réalisées trois fois.

La *p*-benzoquinone inhibe la production de violacéine de TC14 à plus de 50% à 100 μM (Figure V-14a), tout comme chez 12472. Par contre, à l'opposé de 12472, l'acide kojique n'a pas montré d'effet sur le QS de TC14 (Figure 75b).

Le test QSI en présence de molécules commerciales a montré que l'esculétine, la *p*-benzoquinone, et l'acide kojique inhibent le QS de *C. violaceum* 12472, tandis que chez TC14 seule la *p*-benzoquinone a montré un effet inhibiteur sur la production de violacéine. Le Tableau 24 répertorie les molécules inhibitrices de la production de violacéine chez TC14 et chez 12472 à des concentrations non toxiques, à 72h de culture.

Tableau 24 Effet d'inhibition du QS des molécules commerciales chez 12472 et chez TC14

Composés	Concentrations (μM)	Pourcentage d'inhibition du QS(%)	
		<i>C. violaceum</i> 12472	<i>P. ulvae</i> TC14
Esculétine	50	38 ± 11	21 ± 6
	100	67 ± 10	79 ± 2
	200	78 ± 3	toxique
<i>p</i> -benzoquinone	10	-	-
	50	37 ± 9	20 ± 8
	100	53 ± 9	42 ± 9
Acide kojique	100	32 ± 11	-
	200	35 ± 7	-
	500	67 ± 15	-

- : Pas d'effet d'inhibition du QS

4.2. Tests QSI avec des analogues synthétiques

Outre les composés commerciaux, des analogues de molécules naturelles, synthétisés au sein du laboratoire MAPIEM ont été testés en inhibition du QS. Ces analogues synthétiques sont des dérivés d'alcaloïdes imidazoliques (OB1 et OB2) et des dérivés de bromotyramines (AS59, AS76 et AS123) qui ont déjà été décrites comme possédant des propriétés antibiofilm et antifouling (Hanssen *et al.*, 2014 ; Linares *et al.*, 2011 ; Schoenfeld *et al.*, 2002). Ainsi, les analogues synthétiques OB1, OB2, AS59, AS76 et AS123 ont été testés en inhibition du QS avec les souches 12472 et TC14. Ces analogues synthétisés au laboratoire ont été sélectionnés sur la base de leur activité antiadhésive vis-à-vis de certaines bactéries marines dont TC14. L'objectif est donc de savoir si leur activité antiadhésive est liée à une activité anti-QS, étant donné qu'ils correspondent à des analogues de synthèse de molécules naturelles ayant montré une activité antiadhésive ou antibiofilm.

4.2.1. Sur le QS de *C. violaceum* 12472

Comme précédemment avec les composés commerciaux, les composés synthétiques ont été testés sur la croissance et le QS de la souche 12472. Les molécules n'étant pas en quantité suffisante pour être testées à des concentrations élevées, les essais n'ont pas été réalisés au-delà de la concentration de 100 μM . Les résultats sont présentés par les Figures 76 et 77.

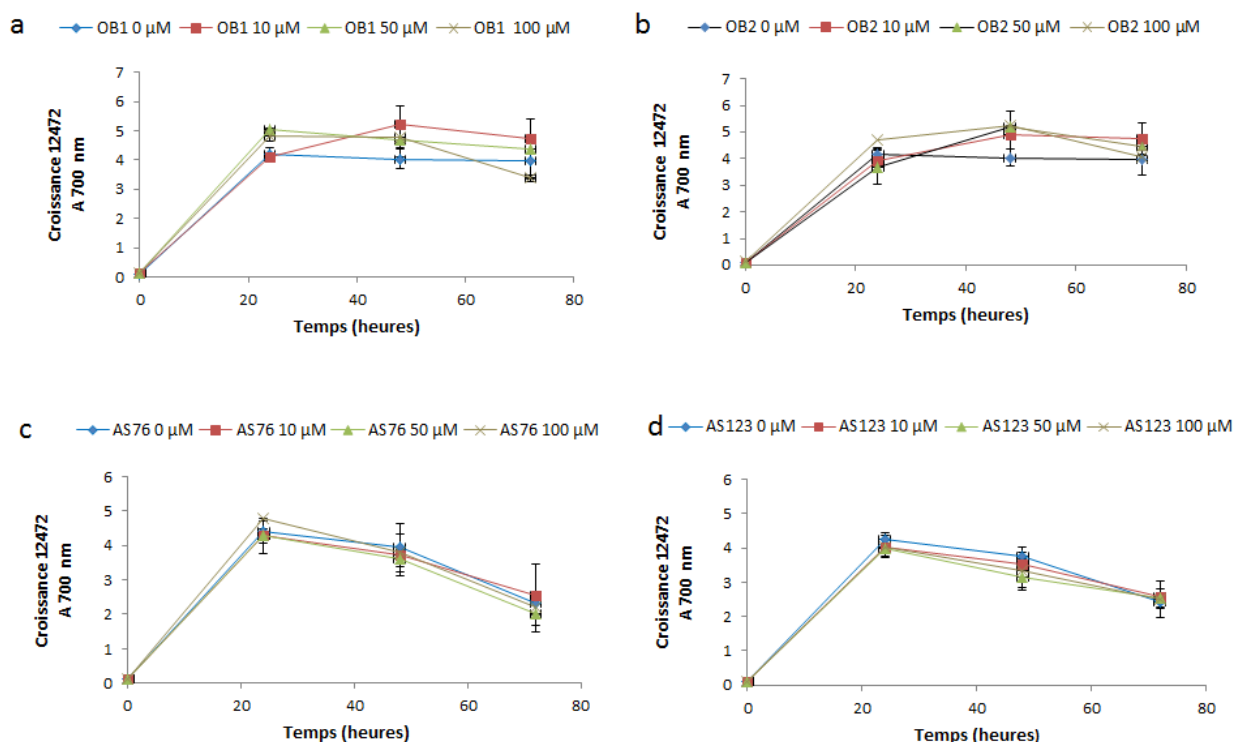


Figure 76 Effet des analogues synthétiques sur la croissance de 12472.

(a) OB1 (b) OB2 (c) AS76 et (d) AS123. Les expériences ont été réalisées trois fois.

Dans l'ensemble, les analogues synthétiques testés n'affectent pas la croissance de 12472. Cependant, les analogues d'alcaloïdes imidazoliques OB1 et OB2 semblent avoir un léger effet stimulateur quand bien même la différence ne soit pas significative sur la croissance de la bactérie. 12472 pourrait donc trouver dans ces composés des éléments de croissance supplémentaires. Selon Martinelli *et al.* en 2004, les molécules qui augmentent la croissance bactérienne sont comparables à des substrats pour les bactéries.

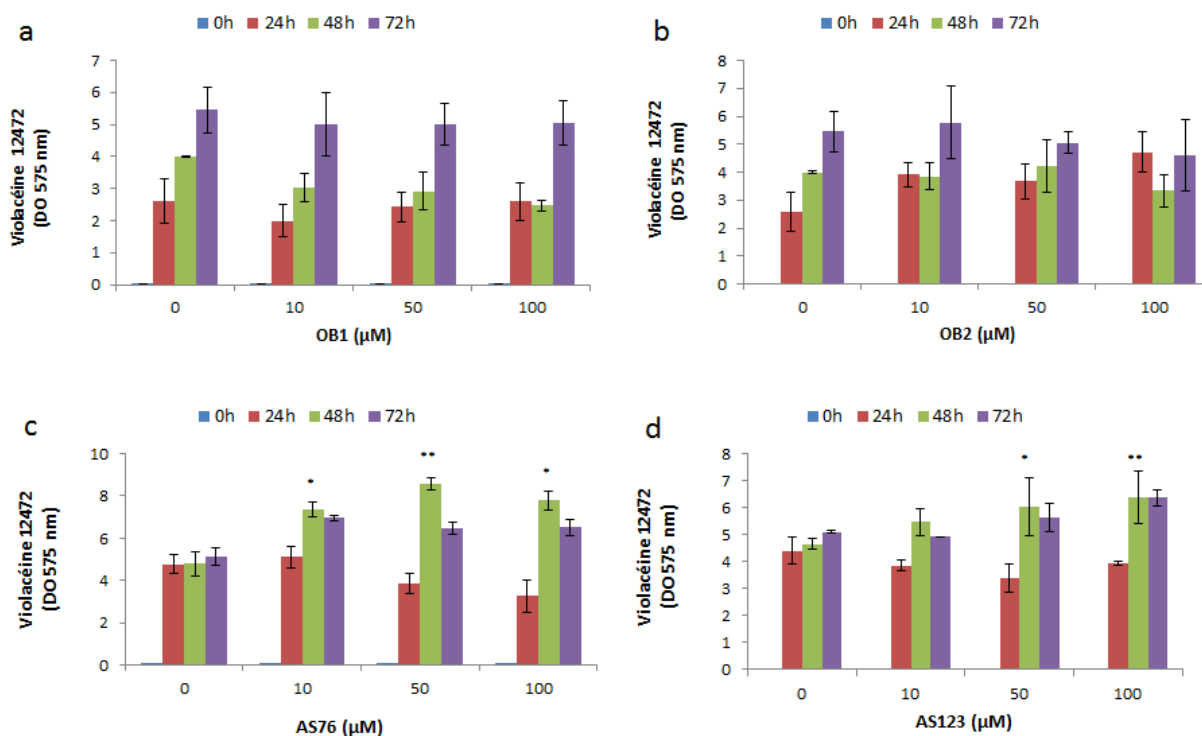


Figure 77 Effet des analogues synthétiques sur le QS de 12472.

(a) OB1 (b) OB2 (c) AS76 et (d) AS123. Les essais marqués d'astérisques sont significativement différents des témoins, culture de 12472 sans molécules ajoutées (0 µM). Chaque expérience a été réalisée trois fois.

Aucun des composés synthétisés n'inhibe le QS de *C. violaceum* 12472. En revanche, les dérivés de bromotyramines AS76 et AS123 semblent activer le QS de 12472 par augmentation de manière significative de la production de violacéine, respectivement à 10 et à 50 µM. L'activation du QS de 12472 par ces molécules serait probablement due à l'activation du récepteur CviR, ce qui reste à démontrer. Certaines études ont fait état de molécules non natives du QS qui induisent l'activité des récepteurs du QS plutôt que de les inactiver. Ainsi, les travaux de Martinelli et collaborateurs en 2004 ont montré qu'une furanone synthétique (nommée composé 12 dans leur étude) mimait l'action de la C₆-HSL par stimulation du récepteur CviR. Ceci se traduisait par une augmentation de la production de violacéine chez la souche CV026. En dehors des furanones halogénées synthétiques, des analogues AHLs ont aussi été décrits comme des stimulateurs de récepteurs QS non apparentés. C'est le cas des molécules 3-oxo-heptanoyl-HSL, 3-oxo-undecanoyl-HSL et 3-oxo-octynoyl-HSL qui activent le récepteur TraR d'*A. tumefaciens*, naturellement apparenté à la 3-oxo-C₈-HSL (Zhu *et al.*, 1998). C'est aussi le cas de l'analogue 3-oxo-C₁₂-(2-aminocyclohexanol) qui a été capable de stimuler le récepteur LasR de *P. aeruginosa* (Smith *et al.*, 2003).

4.2.2. Sur le QS de TC14

TC14 a aussi été utilisé comme biosenseur pour le screening des analogues synthétiques à activité anti-QS. Les Figures 78 et 79 renseignent sur l'effet des molécules synthétiques sur la croissance et la production de violacéine de TC14.

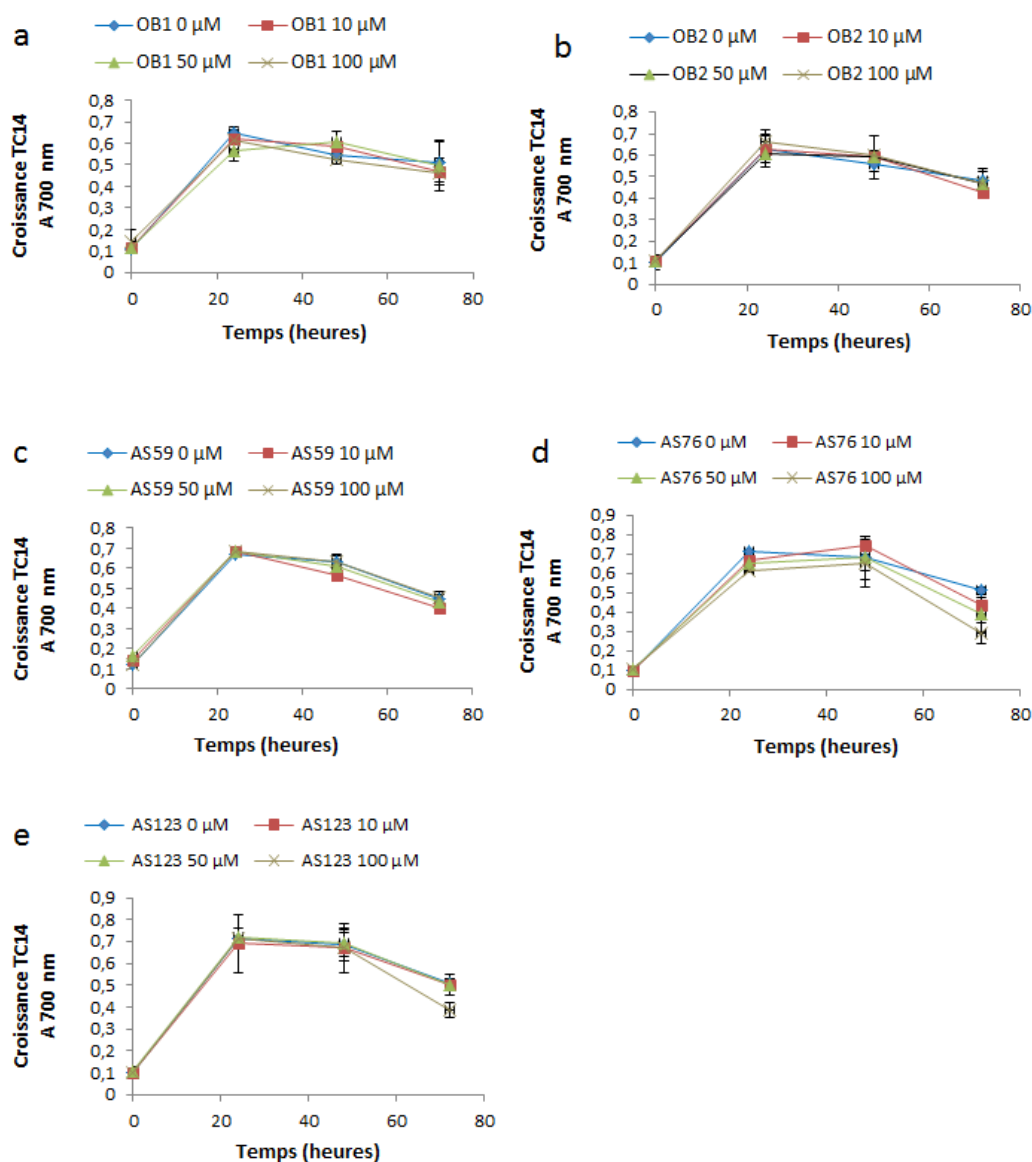


Figure 78 Effet des analogues synthétiques sur la croissance de TC14. (a) OB1(b) OB2 (c) AS59 (d) AS76 et (e) AS123. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Il ressort que les analogues synthétiques n'affectent pas la croissance de TC14 dans l'ensemble excepté le dérivé de bromotyramine AS76 à 100 µM qui diminue significativement la croissance à 72h.

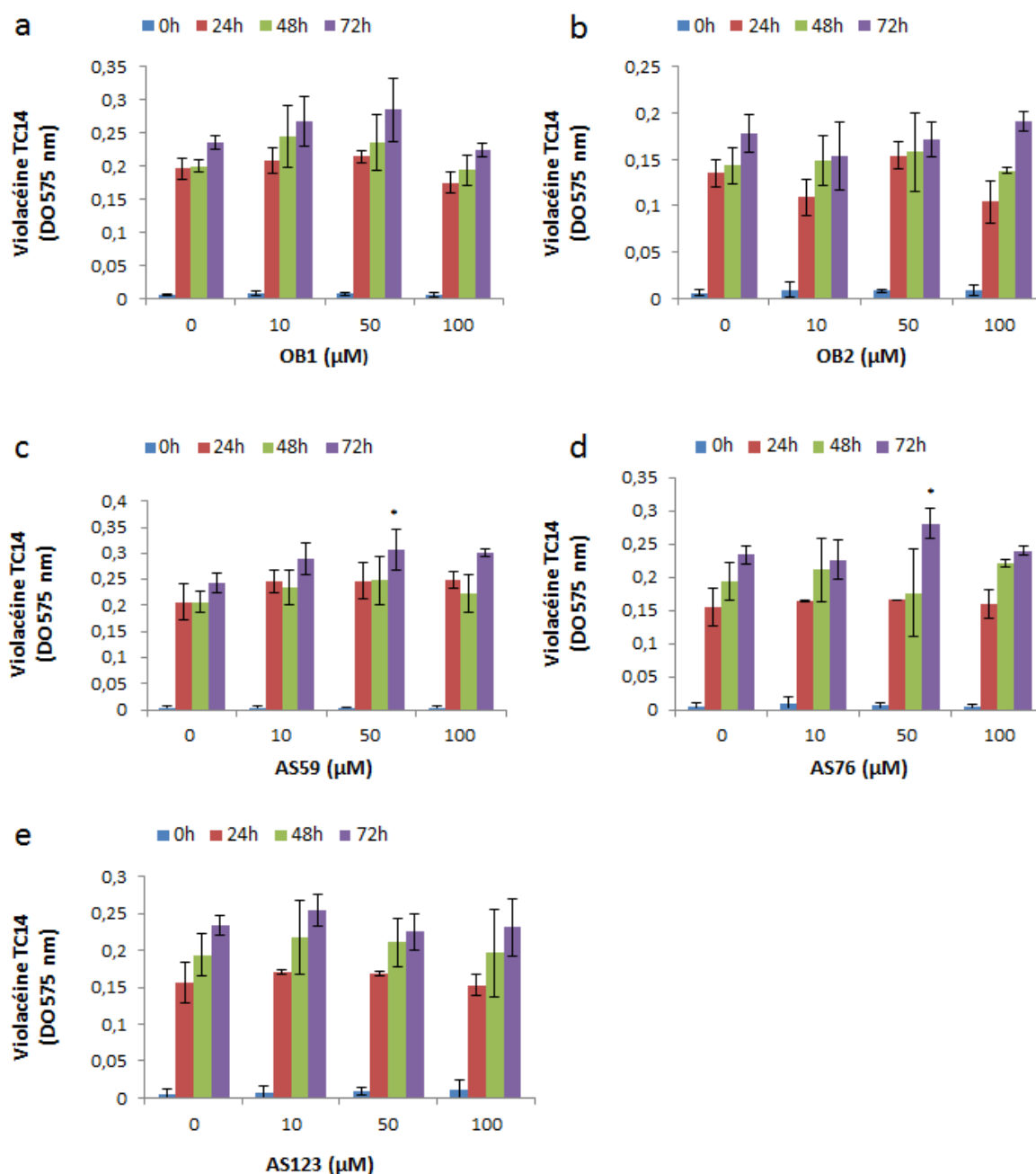


Figure 79 Effet des analogues synthétiques sur la production de violacéine de TC14. (a) OB1 (b) OB2 (c) AS59 (d) AS76 et (e) AS123. Les expériences ont été réalisées trois fois.

Tout comme chez 12472, les analogues synthétiques n'inhibent pas la production de violacéine de TC14, mais semblent pour certains l'induire (AS59 et AS76).

Le Tableau 25 récapitule l'effet d'induction des analogues synthétiques sur le QS de 12472 et de TC14.

Tableau 25 Effet d'induction du QS des analogues synthétiques chez 12472 et chez TC14.

Composés	Concentration (μM)	% d'induction du QS	
		<i>C. violaceum</i> 12472	<i>P. ulvae</i> TC14
OB1	10	-	13 \pm 11
	50	-	20 \pm 15
	100	-	-
OB2	10	-	-
	50	-	-
	100	-	-
AS59	10	-	19 \pm 10
	50	-	26 \pm 9
	100	-	26 \pm 9
AS76	10	36 \pm 9	-
	50	25 \pm 14	20 \pm 16
	100	27 \pm 7	-
AS123	10	-	-
	50	10 \pm 11	-
	100	23 \pm 7	-

- : Pas d'effet d'induction et d'inhibition du QS

Le but de cette partie de la thèse a été d'identifier des molécules inhibitrices du QS à partir des essais d'inhibition du QS avec TC14 et le biosenseur de référence 12472. Il ressort que les molécules commerciales ont montré en général un effet d'inhibition chez l'une ou chez l'autre des deux bactéries, tandis que les analogues synthétiques du laboratoire ont plutôt montré un effet d'induction.

Au nombre des molécules commerciales, l'esculétine et la *p*-benzoquinone ont été actives sur le QS des deux bactéries à des concentrations non toxiques alors que l'acide kojique n'a montré d'effet anti-QS que sur 12472. La découverte de molécules anti-QS à large spectre, c'est-à-dire perturbant le système QS de plusieurs bactéries à la fois Gram négatif comme positif est une alternative intéressante à la recherche de molécules antibiofilm et antifouling, sachant que le biofilm est très souvent initié par le QS chez diverses bactéries. La perturbation du QS bactérien reste une solution de lutte contre l'établissement des biofilms bactériens qui sont à l'origine de la survenue des infections et du biofouling. L'interférence avec le QS bactérien par des inhibiteurs du QS peut se faire de plusieurs manières. Soit les molécules QSIs inactivent la protéine synthase dans le cas des bactéries qui en produisent telle que *C. violaceum* 12472 (Burt *et al.*, 2014 ; Givskov *et al.*, 1996), soit elles miment les signaux naturels en bloquant le site de fixation au niveau des récepteurs, comme dans le cas des furanones halogénées et des dicétopipérazines avec plusieurs récepteurs homologues de

LuxR (Fray, 2002; Givskov *et al.*, 1996 ; Hentzer *et al.*, 2002 ; Manefield *et al.*, 1999) ou encore en dégradant les signaux comme le cas des enzymes lactonases et acylases (Dong *et al.*, 2000 ; Dong & Zhang, 2005). Dobretsov et collaborateurs (2011) ont argumenté dans ce sens en stipulant que l'inhibition du QS du biosenseur CV017 peut se faire soit directement par le blocage de la production des AHLs, soit indirectement par le blocage du récepteur. L'inhibition de la production de violacéine chez le biosenseur 12472 par l'esculétine, la *p*-benzoquinone ainsi que l'acide kojique est certainement liée à l'inhibition du système QS qui est à l'origine de la production de violacéine chez cette souche. L'inhibition du QS de 12472 par ces molécules serait due à un blocage du site de fixation de l'AHL au niveau du récepteur QS et non au niveau de la synthase. Ces mêmes molécules ont été préalablement décrites dans la littérature comme étant des inhibiteurs du QS chez le biosenseur CV026, une souche qui ne produit pas d'AHL, mais qui produit de la violacéine après ajout d'AHLs exogènes (Brackman *et al.*, 2009). Quant à TC14, le mécanisme de la production et celui de l'inhibition de violacéine restent pour le moment inconnus bien qu'ils semblent être régulés par des AHLs exogènes. L'inhibition de la production de violacéine par des molécules exogènes telles que l'esculétine, la *p*-benzoquinone et l'acide kojique pourrait se faire par un mécanisme complètement indépendant du QS. Un exemple d'inhibition de violacéine indépendante du QS est l'inhibition directe de la synthèse de violacéine par le tryptophane, comme l'ont déjà suggéré Dobretsov *et al.* en 2011.

Contrairement aux molécules commerciales, certains analogues synthétiques comme l'AS59, l'AS76 et l'AS123 ont plutôt induit la production de violacéine, à des concentrations non toxiques chez les deux souches. Parmi elles, l'AS76 aurait montré une activité antiadhésive intéressante chez TC14 (Andjouh, comm. pers.). Ces résultats confirment le fait que le QS n'est pas très souvent impliqué dans le processus de l'adhésion bactérienne comme l'ont mentionné plusieurs auteurs (Davies *et al.*, 1998 ; Waters & Bassler, 2005).

5. Conclusion

Le dernier chapitre de la thèse a porté sur l'inhibition du QS en général et en particulier le QS chez une bactérie marine *P. ulvae* TC14. TC14 peut servir d'outil de tests pour le criblage de molécules actives inhibant le QS, avec pour objectif d'identifier des molécules respectueuses de l'environnement qui peuvent inhiber la formation de biofilms bactériens. Ainsi, des composés commerciaux aussi bien que des analogues synthétiques de composés naturels et des extraits de bactéries ont été testés en inhibition du QS, en évaluant soit la production de violacéine de TC14, soit celle du biosenseur de référence 12472. Il faut retenir que certaines bactéries ainsi que leurs extraits organiques réduisent la production de violacéine sans affecter la croissance de TC14. La recherche de molécules références d'inhibition de violacéine chez TC14 a permis d'identifier l'esculétine. Cette dernière ayant démontré une activité inhibitrice intéressante sur la production de violacéine a été considérée comme une référence positive d'inhibition du QS de TC14 au même titre que l'AHL 3-oxo-C₆-HSL. L'esculétine a également montré un effet inhibiteur sur le swimming, la formation de biofilm, mais pas sur l'adhésion de TC14. En outre, la culture de TC14 en présence des activateurs de la production de violacéine et de l'esculétine a révélé qu'il pourrait exister une compétition entre l'esculétine et les activateurs de la production de violacéine, notamment la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL. Les deux molécules à partir de 25 µM parviennent à améliorer la production de violacéine inhibée par 100 µM d'esculétine. Par contre, la C₆-HSL également testée en parallèle avec l'esculétine n'est pas parvenue à compenser la production de violacéine contrairement aux deux autres AHLs, montrant ainsi l'existence d'un éventuel récepteur du QS ayant plus d'affinité pour certaines AHLs que pour d'autres. Enfin, les tests d'inhibition du QS effectués sur TC14 et 12472 avec des composés commerciaux et des analogues synthétisés au laboratoire ont montré un effet QSI intéressant de l'esculétine, de la *p*-benzoquinone et de l'acide kojique sur le QS de 12472 et de la *p*-benzoquinone uniquement sur la production de violacéine de TC14, sans effet toxique. Certaines molécules telles que le carvacrol se sont révélées toxiques même à faible concentration. Les essais avec les analogues synthétiques ayant déjà présenté une activité antiadhésive montrent qu'aucun d'eux n'inhibent le QS des deux souches. Cependant, certains composés tels que l'AS76 et l'AS123 ainsi que l'AS59 et l'AS76 ont plutôt montré un effet inducteur sur la production de violacéine de 12472 et de TC14 respectivement. Le screening des molécules anti-QS pourra permettre de cribler autrement ces analogues de synthèse avant de les tester pour leur activité antiadhésive ou antibiofilm.

Conclusion générale & perspectives

Conclusion générale

L'une des stratégies pouvant être utilisées pour limiter le développement des biofilms en général est l'interférence avec le système de communication des bactéries. Ceci est également le cas dans le secteur marin où le développement des biofilms microbiens sur les surfaces inertes immergées, telles que les coques de bateaux reste un enjeu majeur qui nécessite d'être étudié. Des molécules respectueuses de l'environnement telles que celles du QS pourraient être utilisées par exemple pour limiter ou déstabiliser le biofilm développé sur des revêtements dits «autonettoyants» (type FRC), hydrophobes et à faible énergie de surface, qui permettent le relargage du macrofouling lorsque le bâtiment est en mouvement mais pas du microfouling, essentiellement composé de bactéries et de diatomées. La présence de ce film microbien entraîne des conséquences non négligeables sur la trainée hydrodynamique du bateau et la consommation de carburant. Ces molécules pourraient être greffées ou relarguées à partir de ces types de revêtements-peintures. L'objectif de cette étude est donc de trouver le moyen d'identifier des molécules interférant avec le QS de bactéries marines, avec pour objectif de limiter l'adhésion et la formation du biofilm sur une surface inerte. Cette étude portant sur la mise en évidence du système QS impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de biofilms naturels dans la rade de Toulon a rapidement suscité la nécessité d'utiliser un outil de test pour le milieu marin qui permettrait de détecter la présence de molécules du QS des bactéries et de tester des molécules à activité anti-QS en conditions salines.

La première partie de cette thèse a porté sur l'identification des AHLs produites par quatre souches marines dont trois souches isolées de la rade de Toulon (TC8, TC14 et TC15), appartenant toutes au genre *Pseudoalteromonas* et une souche isolée du golfe du Morbihan 4M6. Les souches *P. lipolytica* TC8, *P. ulvae* TC14 et *Paracoccus* sp. 4M6 qui ont été préalablement décrites comme formant un biofilm conséquent (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Grasland *et al.*, 2003) ne produisent pas de molécules du QS de type AHLs. Cependant, la souche *Pseudoalteromonas* sp. TC15 produit une AHL qui a été identifiée comme étant la C₁₂-HSL. La capacité des bactéries à adhérer, à former un biofilm et à se déplacer (un phénotype qui peut être associé à l'adhésion et à la formation de biofilm selon les cas) a été évaluée en présence de la C₁₂-HSL commerciale chez TC15. Cette AHL semble réduire la mobilité par swimming de TC15. L'évaluation de la capacité d'adhésion des bactéries non productrices d'AHLs en présence de molécules d'AHLs exogènes a montré que certaines AHLs inhibent l'adhésion bactérienne. C'est l'exemple des dérivés d'AHLs oxo-substitués (3-

oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL) qui inhibent significativement l'adhésion de TC14. C'est aussi le cas de la C₁₄-HSL et de la 3-oxo-C₆-HSL qui, en plus de diminuer l'adhésion, réduisent également le swimming et le swarming de 4M6. Ceci montre que, quand bien même une bactérie ne produit pas d'AHL, elle peut être sensible à des AHLs produites par des bactéries voisines. Le fait que les mêmes AHLs soient impliquées dans l'inhibition de l'adhésion et de la mobilité prouve que l'adhésion et la mobilité sont deux processus physiologiques souvent étroitement liés chez certaines bactéries.

La deuxième partie de cette thèse a été inspirée d'un verrou technologique rencontré au cours de réalisation de la première partie de la thèse. Tout est parti d'un constat selon lequel les bactéries marines rencontraient des difficultés à croître sur les milieux de cultures pour biosenseurs et inversement. Puisque les souches marines, spécifiquement les souches *Vibrio* ne sont que très peu ou rarement utilisées pour la détection des AHLs (Steindler & Venturi, 2007), l'idée a donc été d'utiliser une bactérie marine capable de se développer correctement en milieu marin en tant que biosenseur, afin de détecter facilement les AHLs des bactéries marines. La souche marine *P. ulvae* TC14 s'est particulièrement distinguée par la capacité à produire de la violacéine et à former un biofilm, deux caractéristiques phénotypiques en relation directe avec la finalité de cette étude, à l'image du biosenseur non marin *C. violaceum* 12472. Puisqu'un certain nombre d'approches employées ont permis de mettre en évidence que TC14 ne produit pas d'AHLs intrinsèques, la sensibilité de cette bactérie vis-à-vis des molécules exogènes a été vérifiée. Ainsi, les AHLs exogènes ont été testées sur la production de violacéine, la formation de biofilm ainsi que la mobilité de TC14, trois processus physiologiques souvent contrôlés par le QS. Des paramètres qui pourraient influencer la production de violacéine ont également été étudiés et comparés. Il s'agit de l'état physiologique, c'est-à-dire la vie en conditions planctoniques ou en conditions sessiles de la bactérie ainsi que les différents milieux de culture. Ainsi, l'état physiologique et le milieu de culture permettant la production de violacéine la plus forte ont donc été mis en évidence, la violacéine étant par ailleurs une molécule à activité biologique intéressante. Concernant l'état physiologique de la bactérie, *P. ulvae* TC14 produit trois fois plus de violacéine en conditions sessiles qu'en conditions planctoniques et cette quantité de violacéine est d'autant plus élevée que la bactérie se trouve en fin de phase stationnaire. Pour ce qui est du type de milieu de culture, il ressort que TC14 produit plus de violacéine en milieu VNSS, dans lequel elle pousse moins bien qu'en MB. Quant à l'influence du QS, il est à noter que certaines AHLs exogènes peuvent soit augmenter, soit diminuer de manière significative la quantité de

violacéine produite par TC14. L'effet des molécules du QS prend en compte également le milieu de culture et l'état physiologique de la bactérie. Par exemple, en conditions planctoniques, les AHLs exogènes sont plus actives en VNSS qu'en MB, tandis qu'en conditions sessiles, elles sont actives dans les milieux. Il faut retenir que la production de violacéine de TC14 est plus accentuée en présence des AHLs suivantes C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL et 3-oxo-C₁₂-HSL en conditions planctoniques et en milieu VNSS. Cependant, elle est diminuée en présence de la 3-oxo-C₆-HSL. Au-delà de la production de violacéine, les AHLs exogènes ont montré une activité antagoniste sur le swimming, notamment la C₁₂-HSL, la 3-oxo-C₆-HSL, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL ainsi que sur la formation de biofilm, singulièrement la 3-oxo-C₆-HSL. Cette partie de la thèse qui a fait l'objet d'une soumission d'article a particulièrement permis de mettre en évidence un outil de test potentiel à partir d'un protocole simple et efficace.

La troisième partie de cette étude a concerné les premiers essais d'inhibition du QS en utilisant TC14 comme biosenseur potentiel. A cet effet, certaines molécules commerciales préalablement décrites dans la littérature comme étant des inhibiteurs du QS de biosenseurs connus, des analogues synthétiques de molécules naturelles isolées d'organismes marins et des extraits de bactéries ont été évaluées pour leur capacité d'inhibition du QS, en les testant sur la production de violacéine de TC14 et de *C. violaceum* 12472. Parmi ces molécules, l'esculétine a montré un effet inhibiteur intéressant sur TC14 avec plus de 90% d'inhibition à 100 µM, et ce déjà aux premières heures de culture, sans montrer d'effet toxique. Avec la 3-oxo-C₆-HSL commerciale, l'esculétine a été considérée comme une référence positive d'inhibition du QS de TC14. Dans l'objectif de vérifier s'il peut exister une interaction entre les agonistes et les antagonistes de la production de violacéine, une culture de TC14 a été traitée en présence de l'esculétine et de trois inducteurs de la production de violacéine séparément. Deux des trois AHLs inductrices, la 3-oxo-C₈-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL restaurent en partie la production de violacéine inhibée par l'esculétine à partir de 25 µM. Il pourrait s'agir d'un mécanisme compétitif existant entre les deux types de molécules pour un récepteur fonctionnel potentiel présent chez TC14. Par contre, la C₆-HSL ne parvient pas à améliorer la production de violacéine. Ces résultats peuvent amener à penser que le récepteur présumé de TC14 aurait plus d'affinité pour la 3-oxo-C₁₂-HSL que pour la C₆-HSL en présence de l'esculétine.

Les essais anti-QS réalisés avec les extraits de bactéries marines ont, dans un premier temps montré que les extraits des bactéries marines TC8, TC15 et 4M6 diminuent la production de

violacéine de TC14. Ce résultat est par ailleurs confirmé lorsque TC14 est striée sur gélose avec les mêmes bactéries. Dans un deuxième temps, alors que des composés commerciaux autres que l'esculétine (*p*-benzoquinone (100 μ M) et acide kojique (200 μ M)) ont révélé une activité inhibitrice sur le QS de 12472 ainsi que la *p*-benzoquinone uniquement sur le QS de TC14 (100 μ M), les analogues synthétiques du labo testés dans cette étude ont inopportunément affiché pour la plupart un effet pro-QS.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que TC14 pourrait être utilisé en tant que biosenseur pour la recherche de molécules anti-QS (ou pro-QS). Ces molécules seront ultérieurement testées sur la formation de biofilm des bactéries marines, l'objectif à plus long terme reste de trouver un moyen de limiter la formation du biofilm en utilisant des molécules non toxiques pour l'environnement.

Perspectives

Cette étude a constitué l'étape initiale dans l'étude générale de la caractérisation du système QS chez des bactéries marines isolées de la rade de Toulon et de sa potentielle implication dans le processus de formation de biofilm de ces bactéries. Elle ouvre de ce fait à de nombreuses perspectives qu'il serait intéressant d'explorer afin d'approfondir l'étude. Nous essayerons ici de les présenter de façon concise et ce, selon quatre grandes parties.

1- L'identification des molécules du QS des bactéries marines

Il serait tout d'abord intéressant d'élargir l'identification à des molécules du QS autres que les AHLs. Il pourrait être notamment recherchés les quinolones (Pesci *et al.*, 1999b) et l'AI-2, qui ont été identifiés chez plusieurs bactéries Gram négatif (Bassler *et al.*, 1994 ; Surette *et al.*, 1999) ainsi que certains dérivés peptidiques tels que les dicétopipérazines (Campbell *et al.*, 2009). Une caractérisation complète du système de communication consisterait donc à élargir la gamme de molécules qui pourraient être impliquées dans le QS des bactéries marines isolées de la rade de Toulon. De plus, il serait bien envisager d'étendre l'identification des molécules du QS à d'autres bactéries isolées de la rade de Toulon qui constituent le souchothèque du laboratoire MAPIEM. En exemple, les espèces du genre *Shewanella* (TC9, TC10 et TC11) pourraient être visées, car après le genre *Pseudoalteromonas*, ce genre est majoritairement représenté parmi les souches TC et les espèces de ce genre sont généralement isolées dans l'environnement marin (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Makemson *et al.*, 1997b ; Satomi *et al.*, 2003). Parallèlement, un autre critère de sélection des bactéries en vue de l'identification des molécules du QS serait de viser les souches qui possèdent une bonne capacité d'adhésion et de formation de biofilm en se basant sur les résultats de Brian-Jaisson et collaborateurs en 2014 mais aussi, en les testant préalablement sur différents revêtements commerciaux ou en développement dans le laboratoire (ce dernier aspect est en cours d'étude). Enfin, à propos de TC15, il conviendrait de déterminer le système QS dans le lequel est impliquée la C₁₂-HSL, ceci en identifiant les homologues *luxI* et *luxR*. Cela pourrait permettre de déterminer le processus contrôlé par le QS chez TC15. Etant donné que les résultats ont montré que la C₁₂-HSL inhibe sur le swimming de TC15, il serait intéressant après avoir identifié le gène de la synthase à l'origine de la C₁₂-HSL, de l'invalider de façon à vérifier si l'adhésion et la nage seraient plus efficace.

2- Le développement de l'outil de test anti-QS avec TC14

Les résultats préliminaires montrent que la production de violacéine et certains phénotypes liés à la formation du biofilm sont influencés/modifiés en présence de molécules AHLs exogènes. Afin de s'assurer/démontrer que la modification de ces phénotypes est directement liée à la présence de ces molécules, il serait intéressant d'identifier les réseaux moléculaires reliant ces différents phénomènes, à savoir le mécanisme de production de la violacéine chez TC14, sa modulation par le QS ainsi que démontrer génétiquement ou moléculairement le lien avec la formation de biofilm. Un exemple serait d'invalider des gènes de cette souche impliqués dans le QS et de vérifier l'effet de cette mutation sur la production de violacéine et la formation de biofilm. Tout d'abord, la vérification de la présence d'homologues de *luxI* (bien que rarement présents au sein des génomes séquencés de bactéries du même genre) et l'invalidation de(s) homologue(s) *luxR* devraient permettre de confirmer ce lien. L'idéal serait bien entendu de faire séquencer le génome de cette souche au préalable. D'autre part, la maîtrise des facteurs de l'environnement ou les états physiologiques de la bactérie qui influent sur ces phénotypes, en particulier la réponse QS permettrait de mieux comprendre ces mécanismes et de contrôler de futures expérimentations qui seront effectuées dans le laboratoire.

3-L'étude de la violacéine de TC14

La violacéine est une molécule à fort intérêt biothérapeutique (Durán & Menck, 2001). Afin d'optimiser les rendements de sa production, il serait intéressant de compléter l'étude des paramètres qui peuvent influencer (augmenter) sa production chez TC14, en testant l'effet d'autres composés du milieu tels que le tryptophane, le glycérol et le glucose, certains antibiotiques (Pantarella *et al.*, 2007) ainsi que l'aération par l'agitation (Yang *et al.*, 2007) sur la production de violacéine. Par ailleurs, la violacéine pourrait avoir un intérêt écologique. En effet, la violacéine produite par TC14 pourrait jouer un rôle écologique lorsque la souche se trouve en présence d'autres bactéries. Pour vérifier cette hypothèse, une co-culture entre une TC14 sauvage et une TC14 invalidée dans les gènes impliqués dans la production de violacéine, avec des souches initialement isolées du même biofilm ainsi que d'autres souches comme des Gram positif ou d'autres organismes (protozoaires...) pourrait être réalisée.

4- L'inhibition du QS

D'autres composés naturels issus d'organismes marins, tels que les extraits de macroalgues (Othmani *et al.*, 2014) ou leurs analogues synthétiques, pourraient être testés sur le QS de TC14. L'ensemble de ces composés pourraient aussi être évalués sur des bactéries ayant d'autres mécanismes QS présents dans leur génome, chez des Gram positif ou des Gram négatif, issues du milieu marin ou terrestre, médical ou agroalimentaire. Les molécules qui auraient montré un effet anti-QS pourraient être testées pour leur capacité antibiofilm.

Dans l'ensemble, ce travail de thèse qui a été initié au laboratoire à mon arrivée, m'a permis d'appréhender de nombreux domaines et approches techniques multidisciplinaires qui sont la microbiologie marine et la chimie des molécules, notamment la chimie analytique dans un laboratoire multidisciplinaire qui est le laboratoire MAPIEM.

Références bibliographiques

- Allesen-Holm M., Barken K. B., Yang L., Klausen M., Webb J. S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M. & Tolker-Nielsen T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* **59**(4): 1114-1128.
- Alzieu C. L., Sanjuan J., Deltreil J. P. & Borel M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin* **17**(11): 494-498.
- Alzieu C. (1991). Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research* **32**(1-4): 7-17.
- Amaya S., Pereira J. A., Borkosky S. A., Valdez J. C., Bardón A. & Arena M. E. (2012). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sesquiterpene lactones. *Phytomedicine* **19**(13): 1173-1177.
- Andersson R. A., Eriksson A. R. B., Heikinheimo R., Mäe A., Pirhonen M., Kõiv V., Hyytiäinen H., Tuikkala A. & Palva E. T. (2000). Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of expREcc. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**(4): 384-393.
- Andersen J. B., Heydorn A., Hentzer M., Eberl L., Geisenberger O., Christensen B. B., Molin S. & Givskov M. (2001). gfp-based *N*-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(2): 575-585.
- Ang S., Horng Y.-T., Shu J.-C. & other authors (2001). The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens*. *Journal of Biomedical Science* **8**(2): 160-169.
- Antônio R. V. & Creczynski-Pasa T. B. (2004). Genetic analysis of violacein biosynthesis of *Chromobacterium violaceum*. *Genetic Molecular resources* **3**(1): 85-91.
- Anwar H., Strap J. L. & Costerton J. W. (1992). Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**(7): 1347-1351.
- Asahi Y., Noiri Y., Igarashi J., Asai H., Suga H. & Ebisu, S. (2010). Effects of *N*-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *Journal of Periodontal Research* **45**(2):255-261.
- Atkinson S., Throup J. P., Stewart G. S. A. B. & Williams P. (1999). A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Molecular Microbiology* **33**(6): 1267-1277.
- Atkinson S., Chang C.-Y., Sockett R. E., Cámara M. & Williams P. (2006). Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *Journal of Bacteriology* **188**(4): 1451-1461.
- August P. R., Grossman T. H., Minor C., Drapper M. P., MacNeil I. A., Pemberton J. M., Call K. M., Holt D. & Osburne M. S. (2000). Sequence analysis of functional characterization of violacein biosynthesis pathway from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**(4): 513-519.

- Barbieri E., Paster B. J., Hughes D., Zurek L., Moser D. P., Teske A. & Sogin M. L. (2001). Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). *Environmental Microbiology* **3**(3): 151-167.
- Bassler B. L., Wright M. & Silverman M. R. (1994). Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* **13**(2): 273-286.
- Bassler B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* **2**(6): 582-587.
- Bassler B. L. (2002). Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**(4): 421-424.
- Bauer W. D. & Robinson J. B. (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology* **13**(3): 234-237.
- Bauer W. D., Mathesius U. & Teplitski M. (2005). Eukaryotes deal with bacterial quorum sensing. *ASM News* **71**(3): 129-135.
- Beck von Bodman, S., Hayman G. T. & Farrand S. K. (1992). Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(2): 643-647.
- Bernbom N., Ng Y. Y., Kjelleberg S., Harder T. & Gram L. (2011). Marine bacteria from Danish Coastal waters show antifouling activity against the marine fouling bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91 and zoospores of the green alga *Ulva australis* independent of bacteriocidal activity. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(24): 8557-8567.
- Bhattarai H. D., Ganti V. S., Paudel B., Lee Y. K., Lee H. K., Hong Y.-K. & Shin H. W. (2007). Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(2) 243-249.
- Blosser R. S. & Gray K. M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods* **40**(1): 47-55.
- Borchardt S. A., Allain E. J., Michels J. J., Stearns G. W., Kelly R. F. & McCoy W. F. (2001). Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(7): 3174-3179.
- Bowman J. P. (2007). Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* **5**(4): 220-241.
- Bozal N., Tudela E., RossellÓ-Mora R., Lalucat J. & Guinea J. (1997). *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an antarctic coastal environment. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(2): 345-351.

- Brackman G., Hillaert U., Van Calenbergh S., Nelis H. J. & Coenye T. (2009). Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Research in Microbiology* **160**(2): 144-151.
- Brady Jr R. F. (2001). A fracture mechanical analysis of fouling release from nontoxic antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **43**(1-3): 188-192.
- Brady R. F. (2005). Fouling release coating for warships. *Defence Science Journal* **55**(1): 71-75.
- Branda S. S., González-Pastor J. E., Ben-Yehuda S., Losick R. & Kolter R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(20): 11621-11626.
- Brian-Jaisson F., Ortalo-Magné A., Guentas-Dombrowsky L., Armougom F., Blache Y. & Molmeret M. (2014). Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbial Ecology*, 1-17.
- Briand J.-F., Djeridi I., Jamet D., Coupé S., Bressy C., Molmeret M., Le Berre B., Rimet F., Bouchez A. & Blache Y. (2012). Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* **28**(5): 453-463.
- Brint J. M. & Ohman D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of Bacteriology* **177**(24): 7155-7163.
- Brockhurst M. A., Hochberg M. E., Bell T. & Buckling A. (2006). Character displacement promotes cooperation in bacterial biofilms. *Current Biology* **16**(20): 2030-2034.
- Brown G. D., Wong H. F., Hutchinson N., Lee S. C., Chan B. K. K. & Williams G. A. (2004). Chemistry and biology of macrolactone A from the marine cyanobacterium *Kyrthothrix maculans*. *Phytochemistry Reviews* **3**(3): 381-400.
- Burja A. M., Banaigs B., Abou-Mansour E., Grant Burgess J. & Wright P. C. (2001). Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron* **57**(46): 9347-9377.
- Burt S. A., Ojo-Fakunle V. T. A., Woertman J. & Veldhuizen E. J. A. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentration. *PLoS ONE* **9**(4): e93414.
- Byers J. T., Lucas C., Salmond G. P. C. & Welch M. (2002). Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *Journal of Bacteriology* **184**(4): 1163-1171.
- Cady N. C., Mckean K. A., Behnke J., Kubec R., Mosier A. P., Kasper S. H., Burz D. S. & Musah R. A. (2012). Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS One* **7**(6): e38492.

- Campbell J., Lin Q., Geske G. D. & Blackwell H. E. (2009). New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chemical Biology* **4**(12): 1051-1059.
- Camps M., Briand J.-F., Guentas-Dombrowsky L., Culioli G., Bazire A. & Blache Y. (2011). Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine Pollution Bulletin* **62**(5): 1032-1040.
- Cao J. G. & Meighen E. A. (1989). Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *Journal of Biological Chemistry* **264**(36): 21670-21676.
- Carlier A., Uroz S., Smadja B., Fray R., Latour X., Dessaux Y. & Faure D. (2003). The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also Encoding N-acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(8): 4989-4993.
- Case R. J., Labbate M. & Kjelleberg S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria *ISME Journal* **2**(2): 345-349.
- Cataldi T. R. I., Bianco G., Frommberger M. & Schmitt-Kopplin P. (2004). Direct analysis of selected N-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**(12): 1341-1344.
- Cataldi T. R. I., Bianco G., Palazzo L. & Quaranta V. (2007). Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **361**(2): 226-235.
- Ceccherelli G. & Cinelli F. (1997). Short-term effects of nutrient enrichment of the sediment and interactions between the seagrass *Cymodocea nodosa* and the introduced green alga *Caulerpa taxifolia* in a Mediterranean bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **217**(2): 165-177.
- Cha C., Gao P., Chen Y.-C., Shaw P. D. & Farrand S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**(11): 1119-1129.
- Chambers L. D., Stokes K. R., Walsh F. C. & Wood R. J. K. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology* **201**(6): 3642-3652.
- Champ M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of The Total Environment* **258**(1-2): 21-71.
- Champ M. A. (2001). The status of the treaty ban TBT in marine antifouling paints and alternatives. *Published in the Proceedings of the 24th UJNR (US/Japan) Marine Facilities Panel Meeting in Hawaii*.
- Champ M. A. (2003). Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Marine Pollution Bulletin* **46**(8): 935-940.

- Chao Y. & Zhang T. (2012). Surface-enhanced raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**(5): 1465-1475.
- Characklis W. G. (1981). Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **23**(9): 1923-1960.
- Chater K. F. & Horinouchi S. (2003). Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* **48**(1): 9-15.
- Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M. & Bernardi T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **68**(3): 605-612.
- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B. L. & Hughson F. M. (2002). Structural identification of quorum-sensing signal containing boron. *Letters to Nature* **415**: 545-549.
- Chernin L. S., Winson M. K., Thompson J. M., Haran S., Bycroft B. W., Chet I., Williams P. & Stewart G. S. A. B. (1998). Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *Journal of Bacteriology* **180** 4435-4441.
- Cho K. W., Lee H.-S., Rho J.-R., Kim T. S., Mo S. J. & Shin J. (2001). New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *Journal of Natural Products* **64**(5): 664-667.
- Choi S. H. & Greenberg E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**(24): 11115-11119.
- Choo J. H., Rukayadi Y. & Hwang J. K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology* **42**(6): 637-641.
- Clark B. R., Engene N., Teasdale M. E., Rowley D. C., Maitainaho T., Valeriote F. A. & Gerwick W. H. (2008). Natural products Chemistry and Taxonomy of the Marine Cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum*. *Journal of Natural Products* **71**(9): 1530-1537.
- Cole S. P., Harwood J., Lee R., She R. & Guiney D. G. (2004). Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* **186**(10): 3124-3132.
- Cramton S. E., Gerke C., Schnell N. F., Nichols W. W. & Götz F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity* **67**(10): 5427-5433.
- Cuadrado-Silva C. T., Castellanos L., Arévalo-Ferro C. & Osorno O. E. (2013). Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. *Biochemical Systematics and Ecology* **46**(0): 101-107.

- Culioli G., Ortalo-Magné A., Valls R., Hellio C., Clare A. S. & Piovetti L. (2008). Antifouling activity of meroditerpenoids from the marine brown alga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Natural Products* **71**(7): 1121-1126.
- Cvitkovitch D. G., Li Y.-H. & Ellen R. P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation* **112**(11): 1626-1632.
- Czajkowski R. & Jafra S. (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica* **56**(1): 1-16.
- Dafforn K. A., Lewis J. A. & Johnston E. L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin* **62**(3) 453-465.
- Daniels R., Vanderleyden J. & Michiels J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **28**(3): 261-289.
- Danoravo R., Company J. B., Corinaldesi C., D'onghia G., Galib B., Gambi C., Gooday A. J., Lampadariou N., Luna G. M., Caterina M., Olu K., Polymenakou P., Raminez-Llodra E., Sabbatini A., Sardà F., Sibuet M. & Tselepides A. (2010). Deep-Sea biodiversity in the Mediterranean Sea: the known, the unknown and unknowable. *Plos one* **5**(8): e11832.
- Davey M. E. & O'toole G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(4): 847-867.
- Davies D. G., Chakrabarty A. M. & Geesey G. G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(4): 1181-1186.
- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W. & Greenberg E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**(5361): 295-298.
- de Kievit T. R. & Iglewski B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* **68**(9): 4839-4849.
- De Nys R., Steinberg P. D., Willemsen P., Dworjanyn S. A., Gabelish C. L. & King R. J. (1995). Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling* **8** (4):259-271.
- Decho A. W., Visscher P. T., Ferry J., Kawaguchi T., He L., Przekop K. M., Norman R. S. & Reid R. P. (2009). Autoinducers extracted from microbial mats reveal a surprising diversity of *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) and abundance changes that may relate to diel pH. *Environmental Microbiology* **11**(2): 409-420.
- Defoirdt T., Boon N., Bossier P. & Verstraete W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**(1-4): 69-88.
- Defoirdt T., Brackman G. & Coenye T. (2013a). Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence? *Trends in Microbiology* **21**(12): 619-624.

- Defoirdt T., Pande G. S. J., Baruah K. & Bossier P. (2013b). The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**(6): 2870-2873.
- Demoss R. D. & Evans N. R. (1959). Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells. *Journal of Bacteriology* **78**: 583-588.
- Dessaux Y., Elmerich C. & Faure D. (2004). La violacéine: une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*. *La Revue de Médecine Interne* **25**(9): 659-662.
- Dheilly A., Soum-Soutéra E., Klein G. L., Bazire A., Compère C., Haras D. & Dufour A. (2010). Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(11): 3452-3461.
- Diggle S. P., Winzer K., Chhabra S. R., Worrall K. E., Cámara M. & Williams P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology* **50**(1): 29-43.
- Dobretsov S. & Qian P.-Y. (2004). The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **299**(1): 35-50.
- Dobretsov S., Dahms H.-U. & Qian P.-Y. (2006). Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* **22**(1): 43-54.
- Dobretsov S., Teplitski M. & Paul V. (2009). Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* **25**(5): 413-427.
- Dobretsov S., Teplitski M., Alagely A., Gunasekera S. P. & Paul V. J. (2010). Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environmental Microbiology Reports* **2**(6): 739-744.
- Dobretsov S., Teplitski M., Bayer M., Gunasekera S., Proksch P. & Paul V. J. (2011). Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**(8): 893-905.
- Dobretsov S., Abed R. M. M. & Teplitski M. (2013). Mini-review: inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling* **29**(4): 423-441.
- Dong Y.-H., Xu J.-L., Li X.-Z. & Zhang L.-H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(7): 3526-3531.
- Dong Y.-H., Gusti A. R., Zhang Q., Xu J.-L. & Zhang L.-H. (2002). Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(4): 1754-1759.

- Dong Y.-H. & Zhang L.-H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *The Journal of Microbiology* **43**(S): 101-109.
- Dow J. M., Crossman L., Findlay K., He Y.-Q., Feng J.-X. & Tang J.-L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(19): 10995-11000.
- Dufour P., Jarraud S., Vandenesch F., Greenland T., Novick R. P., Bes M., Etienne J. & Lina G. (2002). High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species. *Journal of Bacteriology* **184**(4): 1180-1186.
- Durán N., Ezaro S. & Campos V. (1983). Bacterial chemistry II. Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais-Academia Brasileira de Ciencias* **55**(3): 231-234.
- Durán N. & Menck C. F. M. (2001). *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology* **27**(3): 201-222.
- Durán N., Justo G. Z., Ferreira C. V., Melo P. S., Cordi L. & Martins D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **48**(3): 127-133.
- Eberhard A., Burlingame A. L., Eberhard C., Kenyon G. L., Nealson K. H. & Oppenheimer N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**(9): 2444-2449.
- Eberl L., Molin S. & Givskov M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology* **181**(6): 1703-1712.
- Eberl L. (2006). Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *International Journal of Medical Microbiology* **296**(2-3): 103-110.
- Egan S., Thomas T., Holmström C. & Kjelleberg S. (2000). Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology* **2**(3): 343-347.
- Egan S., Holmström C. & Kjelleberg S. (2001). *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(4): 1499-1504.
- Egan S., James S. & Kjelleberg S. (2002). Identification and characterization of a putative transcriptional regulator controlling the expression of fouling inhibitors in *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(1): 372-378.
- Enger Ø., Nygaard H., Solberg M., Schei G., Nielsen J. & Dundas I. (1987). Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**(4): 416-421.

- Evans S. M., Leksono T. & McKinnell P. D. (1995). Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* **30**(1): 14-21.
- Farrand S. K., Qin Y. & Oger P. (2002). Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. In *Methods in Enzymology* 385: 452-484.
- Fenical W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews* **93**(5): 1673-1683.
- Flemming H.-C. & Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**(9): 623-633.
- Flemming H.-C. (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **86**(2): 251-259.
- Fray R. G. (2002). Altering plant-microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing. *Annals of Botany* **89**(3): 245-253.
- Fuqua W. C. & Winans S. C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology* **176**(10): 2796-2806.
- Fuqua W. C., Winans S. C. & Greenberg E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density -responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **176**(2): 269-275.
- Fuqua C. & Winans S. C. (1996). Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *Journal of Bacteriology* **178**(2): 435-440.
- Fuqua C. & Greenberg E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Molecular cell Biology* **3**: 685-695.
- Gallacher S. & Birkbeck T. H. (1993). Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(11): 3981-3983.
- García-Aljaro C., Vargas-Cespèdes G. J. & Blanch A. R. (2012). Detection of acylated homoserine lactones produced by *Vibrio* spp. and related species isolated from water and aquatic organisms. *Journal of Applied Microbiology* **112**(2): 383-389.
- Gardères J., Taupin L., Saïdin J. B., Dufour A. & Pennec G. (2012). N-acyl homoserine lactone production by bacteria within the sponge *Suberites domuncula* (Olivi, 1792) (Porifera, Demospongiae). *Marine Biology* **159**(8): 1685-1692.
- Gauthier M. J. (1976). *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **26**(4): 459-466.

- Gauthier M. J. & Flatau G. N. (1976). Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Canadian Journal of Microbiology* **22**(11): 1612-1619.
- Gauthier M. J. (1977). *Alteromonas citrea*, a new gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**(4): 349-354.
- Gauthier M. J. & Breittmayer V. A. (1979). A New antibiotic-producing bacterium from Seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**(4): 366-372.
- Gauthier G., Gauthier M. & Christen R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**(4): 755-761.
- Gerber N. N. & Gauthier M. J. (1979). New prodigiosin-like pigment from *Alteromonas rubra*. *Applied and Environmental Microbiology* **37**(6): 1176-1179.
- Geske G. D., Wezeman R. J., Siegel A. P. & Blackwell H. E. (2005). Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society* **127**(37): 12762-12763.
- Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P. D. & Kjelleberg S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology* **178**(22): 6618-6622.
- Givskov M., Östling J., Eberl L., Lindum P. W., Christensen A. B., Christiansen G., Molin S. & Kjelleberg S. (1998). Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**(3): 742-745.
- Glessner, A., Smith, R. S., Iglewski, B. H. & Robinson, J. B. (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *Journal of Bacteriology* **181**, 1623-1629.
- Gov Y., Borovok I., Korem M., Singh V. K., Jayaswal R. K., Wilkinson B. J., Rich S. M. & Balaban N. (2004). Quorum sensing in staphylococci is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. *Journal of Biological Chemistry* **279**(15): 14665-14672.
- Gram L., de Nys R., Maximilien R., Givskov M., Steinberg P. & Kjelleberg S. (1996). Inhibitory effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* on swarming motility of *Proteus mirabilis*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(11): 4284-4287.
- Gram L., Grossart H.-P., Schlingloff A. & Kjørboe T. (2002). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(8): 4111-4116.

Grasland B., Mitalane J., Briandet R., Quemener E., Meylheuc T., Linossier I., Vallee-Rehel K. & Haras D. (2003). Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* **19**(5): 307-313.

Guo X., Zheng L., Zhou W., Cui Z., Han P., Tian L. & Wang X. (2011). A case study on chemical defense based on quorum sensing: antibacterial activity of sponge-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 induced by quorum sensing mechanisms. *Annals of Microbiology* **61**(2): 247-255.

Hall-Stoodley L. & Stoodley P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology* **13**(3): 228-233.

Hall-Stoodley L., Costerton J. W. & Stoodley P. (2004). Bacterial biofilm: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**(2): 95-108.

Hall-Stoodley L. & Stoodley P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology* **13**(1): 7-10.

Hammer B. K. & Bassler B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **50**(1): 101-104.

Hansen A. J., Weeks O. B. & Colwell R. R. (1965). Taxonomy of *Pseudomonas piscicida* (Bein) Buck, Meyers, and Leifson. *Journal of Bacteriology* **89**(3): 752-761.

Hanssen K. Ø., Cervin G., Trepas R., Petitbois J., Haug T., Hansen E., Andersen J., Pavia H.; Hellio C. & Svenson J. (2014). The bromotyrosine derivative ianthelline isolated from the Arctic marine sponge *Stryphnus fortis* inhibits marine micro- and macrobiofouling. *Marine Biotechnology* **16**(6): 684-694.

Hanzelka B. L. & Greenberg E. P. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *Journal of Bacteriology* **178**(17): 5291-5294.

Haras D. (2005). Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux et Techniques* **93**(Hors Série) s.27-s.41.

Harshad L., Diby P. & Hyang K. (2014). Isolation and molecular characterization of biofouling bacteria and profiling of quorum sensing signal molecules from membrane bioreactor activated sludge. *International Journal of Molecular Sciences* **15**(2): 2255-2273.

Hawiger J., Timmons S., Strong D. D., Cottrell B. A., Riley M. & Doolittle R. F. (1982). Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor. *Biochemistry* **21**(6): 1407-1413.

Hayashida-Soiza G., Uchida A., Mori N., Kuwahara Y. & Ishida Y. (2008). Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *Journal of Applied Microbiology* **105**(5): 1672-1677.

- Hellio C., De La Broise D., Dufossé L., Le Gal Y. & Bourgougnon N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research* **52**(3): 231-247.
- Henke J. M. & Bassler B. L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology* **14**(11): 648-656.
- Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T. B., Heydorn A., Andersen J. B., Parsek M. R., Rice S. A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S. & Givskov M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**(1): 87-102.
- Heydorn A., Nielsen A. T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B. K. & Molin S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**(10): 2395-2407.
- Hoang T. T. & Schweizer H. P. (1999). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *Journal of Bacteriology* **181**(17): 5489-5497.
- Hogan D. A. (2006). Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Current Biology* **16**(12): R457-R458.
- Holden M. T. G., Ram Chhabra S., De Nys R., Stead P., Bainton N. J., Hill P. J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G. P. C., Stewart G. S. A. B., Bycroft B. W., Kjelleberg S. & Williams P. (1999). Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* **33**(6): 1254-1266.
- Holmström C., James S., Neilan B. A., White D. C. & Kjelleberg S. (1998). *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**(4): 1205-1212.
- Holmström C. & Kjelleberg S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* **30**(4): 285-293.
- Holmström C., Egan S., Franks A., McCloy S. & Kjelleberg S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* **41**(1): 47-58.
- Horng Y.-T., Deng S.-C., Daykin M., Soo P.-C., Wei J.-R., Luh K.-T., Ho S.-W., Swift S., Lai H.-C. & Williams P. (2002). The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Molecular Microbiology* **45**(6): 1655-1671.
- Hoshino T., Takano T., Hori S. & Ogasawara N. (1987). Biosynthesis of violacein: origins of hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus. *Agricultural and Biological Chemistry* **51**(10): 2733-2741.

- Huang Y.-L., Dobretsov S., Ki, J.-S., Yang L.-H. & Qian P.-Y. (2007). Presence of acyl-homoserine lactone in subtidal biofilm and the implication in larval behavioral response in the polychaete *Hydroides elegans*. *Microbial Ecology* **54**(2): 384-392.
- Huang Y.-L., Ki J.-s., Le O. O. & Qian P.-Y. (2009). Evidence for the dynamics of acyl homoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *The ISME Journal* **3**: 296-304.
- Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S. & Eberl L. (2001). The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**(9): 2517-2528.
- Isnansetyo A. & Kamei Y. (2003). MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30T, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(2): 480-488.
- Ivanova E. P., Kiprianova E. A., Mikhailov V. V., Levanova G. F., Garagulya A. D., Gorshkova N. M., Vysotskii M. V., Nicolau D. V., Yumoto N., Taguchi T. & Yoshikawa S. (1998). Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**(1): 247-256.
- Ivanova E. P., Sawabe T., Alexeeva Y. V., Lysenko A. M., Gorshkova N. M., Hayashi K., Zukova N. V., Christen R. & Mikhailov V. V. (2002). *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(1): 229-234.
- Jaki B., Orjala J., Heilmann J., Linden A., Vogler B. & Sticher O. (2000). Novel extracellular diterpenoids with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Natural Products* **63**(3): 339-343.
- James S. G., Holmström C. & Kjelleberg S. (1996). Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(8): 2783-2788.
- Jarrell K. F. & McBride M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Review Microbiology* **6**(6): 466-476.
- Jelsbak L. & Søgaard-Andersen L. (2003). Cell behavior and cell-cell communication during fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Microbiological Methods* **55**(3): 829-839.
- Jimenez P. N., Koch G., Papaioannou E., Wahjudi M., Krzeslak J., Coenye T., Cool R. H. & Quax W. J. (2010). Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology* **156**(1): 49-59.
- Kalia V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances* **31**(2): 224-245.

- Kalinovskaya N. I., Ivanova E. P., Alexeeva Y. V., Gorshkova N. M., Kuznetsova T. A., Dmitrenok A. S. & Nicolau D. V. (2004). Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. *Current Microbiology* **48**(6): 441-446.
- Kanagasabhapathy M., Yamazaki G., Ishida A., Sasaki H. & Nagata S. (2009). Presence of quorum-sensing inhibitor-like compounds from bacteria isolated from the brown alga *Colpomenia sinuosa*. *Letters in Applied Microbiology* **49**(5): 573-579.
- Kaplan H. B. & Greenberg E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of Bacteriology* **163**: 1210-1214.
- Karygianni L., Follo M., Hellwig E., Burghardt D., Wolkewitz M., Anderson A. & Al-Ahmad A. (2012). Microscope-based imaging platform for large-scale analysis of oral biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(24): 8703-8711.
- Kelly R. C., Bolitho M. E., Higgins D. A. & other authors (2009). The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of biosynthetic enzyme CqsA. *Natural Chemical Biology* **5**(12): 891-895.
- Kendall M. M. & Sperandio V. (2007). Quorum sensing by enteric pathogens. *Current Opinion in Gastroenterology* **23**: 10-15.
- Khan S. R., Mavrodi D. V., Jog G. J., Suga H., Thomashow L. S. & Farrand S. K. (2005). Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR Homolog PhzR, N-(3-OH-hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting *phz* Box. *Journal of Bacteriology* **187**(18): 6517-6527.
- Kim H. S., Hayashi M., Shibata Y., Wataya Y., Mitamura T., Horii T., Kawauchi K., Hirata H., Tsuboi S. & Moriyama Y. (1999). Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. *Biological & pharmaceutical bulletin* **22**(5): 532-534.
- Kim J., Kim Y., Seo Y. & Park S. (2007). Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **12**(3): 308-311.
- Kjelleberg S. & Molin S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology* **5**(3): 254-258.
- Kleerebezem M., Quadri L. E. N., Kuipers O. P. & De Vos W. M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **24**(5): 895-904.
- Klein G. L., Soum-Soutéra E., Guede Z., Bazire A., Compère C. & Dufour A. (2011). The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* **27**(8): 931-940.
- Kodani S., Imoto A., Mitsutani A. & Murakami M. (2002). Isolation and identification of the anti-algal compound, harmane (1-methyl- β -carboline), produced by the algicidal bacterium, *Pseudomonas* sp. K44-1. *Journal of Applied Phycology* **14**(2): 109-114.

- Komiya-Ito A., Ito T., Yamanaka A., Okuda K., Yamada S. & Kato T. (2006). *N*-tetradecanoyl homoserine lactone, signaling compound for quorum sensing, inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth. *Research Journal of Microbiology* **1**(4): 353-359.
- Kristensen J. B., Meyer R. L., Laursen B. S., Shipovskov S., Besenbacher F. & Poulsen C. H. (2008). Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnology Advances* **26**(5): 471-481.
- Kwan J. C., Teplitski M., Gunasekera S. P., Paul V. J. & Luesch H. (2010). Isolation and biological evaluation of 8-epi-malyngamide C from the Floridian marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products* **73**(3): 463-466.
- Labbate M., Queck S. Y., Koh K. S., Rice S. A., Givskov M. & Kjelleberg S. (2004). Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology* **186**(3): 692-698.
- Labbate M., Rice S. A., Queck J., Givskov M. & Kjelleberg S. (2001) Attachment and formation of biofilm structures in *S. liquefaciens*MG1 is regulated by *N*-butanoyl-l-homoserine lactone. Abstract MO.042 of the Ninth International Symposium on Microbial Ecology, 2001August 26–31, Amsterdam.
- LaSarre B. & Federle M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**(1): 73-111.
- Lazar V. (2011). Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe* **17**(6): 280-285.
- Lazazzera B. A., Solomon J. M. & Grossman A. D. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell* **89**(6): 917-925.
- Lazazzera B. A. & Grossman A. D. (1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology* **6**(7): 288-294.
- Lazazzera B. A. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology* **3**(2): 177-182.
- Leadbetter J. R. & Greenberg E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* **182**(24): 6921-6926.
- Lee J., Jayaraman A. & Wood T. (2007). Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology* **7**(1): 42.
- Lee J.-W., Nam J.-H., Kim Y.-H., Lee K.-H. & Lee D.-H. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *The Journal of Microbiology* **46**(2): 174-182.
- Leichstein H. C. & Van de Sand V. F. (1945). Violacein an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Diseases* **76**: 47-51.

- Lejars M., Margaillan A. & Bressy C. (2012). Fouling release coatings: a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chemical Reviews* **112**(8): 4347-4390.
- Leon L. L., Miranda C. C., De Souza A. O. & Durán N. (2001). Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**(3): 449-450.
- Leroy C., Delbarre-Ladrat C., Ghillebaert F., Rochet M. J., Compère C. & Combes D. (2007). A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents. *Letters in Applied Microbiology* **44**(4): 372-378.
- Li X., Yan Z. & Xu J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**(2): 353-362.
- Li Y.-H. & Tian X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* **12**(3): 2519-2538.
- Liaw S.-J., Lai H.-C., Ho S.-W., Luh K.-T. & Wang W.-B. (2003). Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *Journal of Medical Microbiology* **52**(1): 19-28.
- Lin Y.-H., Xu J.-L., Hu J., Wang L.-H., Ong S. L., Leadbetter J. R. & Zhang L.-H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology* **47**(3): 849-860.
- Linares D., Bottzeck O., Pereira O., Praud-Tabariès A. & Blache Y. (2011). Designing 2-aminoimidazole alkaloids analogs with anti-biofilm activities: structure-activities relationships of polysubstituted triazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**(22): 6751-6755.
- Lindsay A. & Ahmer B. M. M. (2005). Effect of sdiA on biosensors of N-acylhomoserine lactones. *Journal of Bacteriology* **187**(14): 5054-5058.
- Lindum P. W., Anthoni U., Christophersen C., Eberl L., Molin S. & Givskov M. (1998). N - acyl-l-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology* **180**(23): 6384-6388.
- Llamas I., Keshavan N. & González J. E. (2004). Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain N-acyl homoserine lactones. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6): 3715-3723.
- Longeon A., Peduzzi J., Barthelemy M., Corre S., Nicolas J.-L. & Guyot M. (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine Biotechnology* **6**(6): 633-641.
- Lu Y., Wang L., Xue Y., Zhang C., Xing X.-H., Lou K., Zhang Z., Li Y., Zhang G., Bi J. & Su Z. (2009). Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal* **43**(2): 135-141.

- Lynch M. J., Swift S., Kirke D. F., Keevil C. W., Dodd C. E. R. & Williams P. (2002). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology* **4**(1): 18-28.
- Lyon G. J. & Novick R. P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* **25**(9): 1389-1403.
- Magin C. M., Cooper S. P. & Brennan A. B. (2010). Non-toxic antifouling strategies. *Materials Today* **13**(4): 36-44.
- Mah T.-F. C. & O'Toole G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**(1): 34-39.
- Makemson J. C., Fulayfil N. R., Landry W., Van Ert L. M., Wimpee C. F., Widder E. A. & Case J. F. (1997). *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**(4): 1034-1039.
- Maki J. S., Rittschof D., Costlow J. D. & Mitchell R. (1988). Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films. *Marine Biology* **97**(2): 199-206.
- Manefield M., de Nys R., Naresh K., Roger R., Givskov M., Peter S. & Kjelleberg S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145**(2): 283-291.
- Mardén P., Tunlid A., Malmcrona-Friberg K., Odham G. & Kjelleberg S. (1985). Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch Microbiol* **142**(4): 326-332.
- Marketon M. M., Gronquist M. R., Eberhard A. & González J. E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *Journal of Bacteriology* **184**(20): 5686-5695.
- Martinelli D., Grossmann G., Sequin U., Brandl H. & Bachofen R. (2004). Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology* **4**(1): 25.
- Maximilien R., de Nys R., Holmström C., Gram L., Givskov M., Crass K., Kjelleberg S. & Steinberg P. D. (1998). Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology* **15**(3): 233-246.
- McCarter L. & Silverman M. (1990). Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology* **4**(7): 1057-1062.
- McCarthy S. A., Johnson R. M. & Kakimoto D. (1994). Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982,85 isolated from Kinko Bay, Japan. *Journal of Applied Bacteriology* **77**(4): 426-432.

- McClellan K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. A. B. & Williams P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**(12): 3703-3711.
- McLean R. J. C., Pierson III L. S. & Fuqua C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods* **58**(3): 351-360.
- Melo S. P., Maria S., Vidal B., Haun M. & Duran N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **36**(8): 539-543.
- Mendes A., de Carvalho J. E., Duarte M. C. T., Durán N. & Bruns R. E. (2001). Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnology Letters* **23**(23): 1963-1969.
- Merritt J., Qi F., Goodman S. D., Anderson M. H. & Shi W. (2003). Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* **71**(4): 1972-1979.
- Miller M. B. & Bassler B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**(1): 165-199.
- Miller M. B., Skorupski K., Lenz D. H., Taylor R. K. & Bassler B. L. (2002). Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**(3): 303-314.
- Milton D. L., Hardman A., Camara M., Chhabra S. R., Bycroft B. W., Stewart G. S. & Williams P. (1997). Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the vanI/vanR locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *Journal of Bacteriology* **179**(9): 3004-3012.
- Minogue T. D., Trebra M. W.-v., Bernhard F. & Bodman S. B. v. (2002). The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Molecular Microbiology* **44**(6): 1625-1635.
- Mitova M., Tutino M., Infusini G., Marino G. & De Rosa S. (2005). Exocellular peptides from antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Marine Biotechnology* **7**(5): 523-531.
- Mohamed N. M., Cicirelli E. M., Kan J., Chen F., Fuqua C. & Hill R. T. (2008). Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environmental Microbiology* **10**(1): 75-86.
- Momb J., Wang C., Liu D., Thomas P. W., Petsko G. A., Guo H., Ringe D. & Fast W. (2008). Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry* **47**(29): 7715-7725.
- Moré M. I., Finger L. D., Stryker J. L., Fuqua C., Eberhard A. & Winans S. C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**(5268): 1655-1658.

- Morikawa M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**(1): 1-8.
- Morin D., Grasland B., Vallée-Réhel K., Dufau C. & Haras D. (2003). On-line high-performance liquid chromatography -mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *Journal of Chromatography A* **1002**(1-2): 79-92.
- Morohoshi T., Shiono T., Takidouchi K., Kato M., Kato N., Kato J. & Ikeda T. (2007). Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(20): 6339-6344.
- Morohoshi T., Kato M., Fukamachi K., Kato N. & Ikeda T. (2008). N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiology Letters* **279**(1): 124-130.
- Morohoshi T., Fukamachi K., Kato M., Kato N. & Ikeda T. (2010). Regulation of the violacein biosynthetic gene cluster by acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**(10): 2116-2119.
- Musk Jr D. J. & Hergenrother P. J. (2006). Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. *Current Medicinal Chemistry* **13**(18): 2163-2177.
- Musthafa K., Saroja V., Pandian S. & Ravi A. (2011). Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). *Journal of Biosciences* **36**(1): 55-67.
- Nadell C. D., Xavier L. B., Levin S. A. & Foster K. R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology* **6**(1): 171-179.
- Nadell C. D., Xavier J. B. & Foster K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* **33**(1): 206-224.
- Nakamura Y., Sawada T., Morita Y. & Tamiya E. (2002). Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. *Biochemical Engineering Journal* **12**(1): 79-86.
- Nealson K. H., Platt T. & Hastings J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* **104**(1): 313-322.
- Nealson K. H. & Hastings J. W. (1979). Bacterial bioluminescence : its control and ecological significance *Microbiological Reviews* **43**(4): 496-518.
- Negri A. P., Webster N. S., Hill R. T. & Heyward A. J. (2001). Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Marine Ecology Progress Series* **223**: 121-131.

- Ní Eidhin D., Perkins S., Francois P., Vaudaux P., Höök M. & Foster T. J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **30**(2): 245-257.
- O'Toole G., Kaplan H. B. & Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**(1): 49-79.
- Odagami T., Morita J., Takama K. & Suzuki S. (1994). Substrate specificities of extracellular proteases produced by marine putrefactive bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Alteromonas haloplanktis*. *Letters in Applied Microbiology* **18**(1): 50-52.
- Olsen S. M., Pedersen L. T., Laursen M. H., Kiil S. & Dam-Johansen K. (2007). Enzyme-based antifouling coatings: a review. *Biofouling* **23**(5): 369-383.
- Ortori C. A., Atkinson S., Chhabra S. R., Cámara M., Williams P. & Barrett D. A. (2007). Comprehensive profiling of N-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**(2): 497-511.
- Ortori C., Dubern J.-F., Chhabra S., Cámara M., Hardie K., Williams P. & Barrett D. A. (2011). Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**(2): 839-850.
- Othmani A., Bouzidi N., Viano Y., Alliche Z., Seridi H., Blache Y., El Hattab M., Briand J.-F. & Culioli, G. (2014). Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean *Dictyota* spp. *Journal of Applied Phycology* **26**(3): 1573-1584.
- Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C. & Schippa S. (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology* **102**(4): 992-999.
- Pantanella F., Valenti P., Natalizi T. & Passeri D. (2013). *Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use.*
- Parker C. T. & Sperandio V. (2009). Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cellular Microbiology* **11**(3): 363-369.
- Parsek M. R., Schaefer A. L. & Greenberg E. P. (1997). Analysis of random and site-directed mutations in *rhII*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Molecular Microbiology* **26**(2): 301-310.
- Parsek M. R., Val D. L., Hanzelka B. L., Cronan J. E. & Greenberg E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(8): 4360-4365.
- Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria : a signaling mechanism involved in associations with higher organisms *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(16): 8789-8793.

- Parsek M. R. & Fuqua C. (2004). Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology* **186**(14): 4427-4440.
- Parsek M. R. & Greenberg E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* **13**(1): 27-33.
- Pearson J. P., Gray K. M., Passador L., Tucker K. D., Eberhard A., Iglewski B. H. & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(1): 197-201.
- Pearson J. P., Passador L., Iglewski B. H. & Greenberg E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(5): 1490-1494.
- Pearson J. P., Pesci E. C. & Iglewski B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology* **179**(18): 5756-5767.
- Peeters E., Nelis H. J. & Coenye T. (2008). Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Journal of Hospital Infection* **70**(4): 361-368.
- Penesyan A., Tebben J., Lee M., Thomas T., Kjelleberg S., Harder T. & Egan S. (2011). Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and related sponge-associated bacteria. *Marine Drugs* **9**(8): 1391-1402.
- Persson T., Johansen S. K., Martiny L., Givskov M. & Nielsen J. (2004). Synthesis of carbon-14 labelled (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone: a potent quorum sensing inhibitor. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **47**(10): 627-634.
- Persson T., Givskov M. & Nielsen J. (2005). Quorum sensing inhibition: targeting chemical communication in Gram negative bacteria. *Current Medicinal Chemistry* **12**(26): 3103-3115.
- Pesci E. C. & Iglewski B. H. (1997). The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends in Microbiology* **5**(4): 132-134.
- Pesci E., Milbank J., Pearson J., McKnight S., Kende A., Greenberg E. & Iglewski B. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceeding of National Academy of Sciences* **96**(20): 11229 - 11234.
- Piola R. F., Dafforn K. A. & Johnston E. L. (2009). The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* **25**(7): 633-644.
- Piper k. R., Von Bodman S. B. & Farrand S. K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**(6419): 448-450.

- Pirhonen M., Flego D., Heikinheimo R. & Palva E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal* **12**(6): 2467-2476.
- Preston B. L. & Shackelford J. (2002). Multiple stressor effects on benthic biodiversity of chesapeake bay: implications for ecological risk assessment. *Ecotoxicology* **11**(2): 85-99.
- Prouty A. M., Schwesinger W. H. & Gunn J. S. (2002). Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity* **70**(5): 2640-2649.
- Punithavathy P. M., Nalina, K. & Menon T. (2012). Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilm against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian journal of pathology and microbiology* **55**(1): 72-74.
- Puskas A., Greenberg E. P., Kaplan S. & Schaefer A. L. (1997). A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* **179**(23): 7530-7537.
- Qian P.-Y., Xu Y. & Fusetani N. (2010). Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* **26**(2): 223-234.
- Raina S., De Vizio D., Odell M., Clements M., Vanhulle S. & Keshavarz T. (2009). Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnology and Applied Biochemistry* **54**(2): 65-84.
- Rajamani S., Bauer W. D., Robinson J. B., Farrow J. M., Pesci E. C., Teplitski M., Gao M., Sayre R. T. & Phillips D. A. (2008). The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum-sensing receptor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(9): 1184-1192.
- Ramage G., Saville S. P., Wickes B. L. & López-Ribot J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5459-5463.
- Rao D., Webb J. S. & Kjelleberg S. (2005). Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(4): 1729-1736.
- Rao, D. Webb J. S. & Kjelleberg S. (2006). Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(8): 5547-5555.
- Rao, D. Webb J. S., Holmström C., Case R., Low A., Steinberg P. & Kjelleberg S. (2007). Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(24): 7844-7852.
- Rasmussen T. B., Manefield M., Andersen J. B., Eberl L., Anthoni U., Christophersen C., Steinberg P., Kjelleberg S. & Givskov M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* **146**(12): 3237-3244.

- Rasmussen T. B., Bjarnsholt T., Skindersoe M. E., Hentzer M., Kristoffersen P., Kôte, M., Nielsen J., Eberl L. & Givskov M. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology* **187**(5): 1799-1814.
- Rasmussen T. B. & Givskov M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology* **296**(2-3): 149-161.
- Reid G. (1999). Biofilms in infectious disease and on medical devices. *International Journal of Antimicrobial Agents* **11**(3-4): 223-226.
- Reise K., Gollasch S. & Wolff W. J. (1998). Introduced marine species of the north Sea coasts. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **52**(3-4): 219-234.
- Ren D., Sims J. J. & Wood T. K. (2001). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology* **3**(11): 731-736.
- Ritter A., Com E., Bazire A., Goncalves M. D. S., Delage L., Pennec, G. L. Pineau C., Dreanno C., Compère C. & Dufour A. (2011). Proteomic studies highlight outer-membrane proteins related to biofilm development in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. D41. *Proteomics* **12**(21): 3180-3192.
- Romero M., Martin-Cuadrado A.-B., Roca-Rivada A., Cabello A. M. & Otero A. (2010). Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **75**(2): 205-217.
- Rudrappa T. & Bais H. P. (2008). Curcumin, a known phenolic from curcuma longa, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(6): 1955-1962.
- Rumbaugh K. P., Chu W., Vatter D. A., Maitin V., Barnes M. B. & McLean R. C. (2011a). Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*. In *Quorum Sensing*, **692** pp. 3-19: Humana Press.
- Rumbaugh K. P., Churchill M. E. A., Sibhatu H. M. & Uhlson C. L. (2011b). Defining the structure and function of acyl-homoserine lactone autoinducers. In *Quorum Sensing*, pp.**692** 159-171: Humana Press.
- Rupp M. E., Ulphani J. S., Fey, P. D. & Mack D. (1999). Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated Infection in a rat model. *Infection and Immunity* **67**(5): 2656-2659.
- Rutherford, S. T. & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**(11).
- Sakata T., Sakaguchi K. & Kakimoto D. (1982). antibiotic production by marine pigmented bacteria I : antibacterial effect of *Alteromonas luteo-violaceus*. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University* **31**: 234-250.

- Salmond G. P. C., Bycroft B. W., Stewart G. S. A. B. & Williams P. (1995). The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Molecular Microbiology* **16**(4): 615-624.
- Salta M., Wharton J. A., Blache Y., Stokes K. R. & Briand J.-F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **15**(11): 2879-2893.
- Saravanan P., Nancharaiah Y. V., Venugopalan V. P., Rao T. S. & Jayachandran S. (2006). Biofilm formation by *Pseudoalteromonas ruthenica* and its removal by chlorine. *Biofouling* **22**(6): 371-381.
- Satomi M., Oikawa H. & Yano Y. (2003). *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(2): 491-499.
- Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. D., Costerton J. W. & Davies D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* **184**(4): 1140-1154.
- Schaefer A. L., Hanzelka B. L., Eberhard A. & Greenberg E. P. (1996a). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *Journal of Bacteriology* **178**(10): 2897-2901.
- Schaefer A. L., Val D. L., Hanzelka B. L., Cronan J. E. & Greenberg E. P. (1996b). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(18): 9505-9509.
- Schaefer A. L., Hanzelka B. L., Parsek M. R. & Greenberg E. P. (2000). Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. In *Methods in Enzymology* **305**: 288-301.
- Schipper C., Hornung C., Bijtenhoorn P., Quitschau M., Grond S. & Streit W. R. (2009). Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(1): 224-233.
- Schoenfeld R. C., Conova S., Rittschof D. & Ganem B. (2002). Cytotoxic, antifouling bromotyramines: A synthetic study on simple marine natural products and their analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**(5): 823-825.
- Schultz M. P. (2007). Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling* **23**(5): 331-341.
- Schultz M. P., Bendick J. A., Holm E. R. & Hertel W. M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**(1): 87-98.

- Seed P. C., Passador L. & Iglewski B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of Bacteriology* **177**(3): 654-659.
- Shaw P. D., Ping G., Daly S. L., Cha C., Cronan J. E., Rinehart K. L. & Farrand S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(12): 6036-6041.
- Shrout J. D., Chopp D. L., Just C. L., Hentzer M., Givskov M. & Parsek M. R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* **62**(5): 1264-1277.
- Siegert W. (1999). Biofilms - the unknown source of contamination *Schülke & Mayr GmbH* **105**(5): 62-66.
- Simidu U., Kita-Tsukamoto K., Yasumoto T. & Yotsu M. (1990). Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**(4): 331-336.
- Skovhus T. L., Holmström C., Kjelleberg S. & Dahllöf I. (2007). Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. *FEMS Microbiology Ecology* **61**(2): 348-361.
- Smith K. M., Bu Y. & Suga H. (2003). Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chemistry & Biology* **10**(1): 81-89.
- Sobolevskaya M. P., Smetanina O. F., Speitling M., Shevchenko L. S., Dmitrenok P. S., Laatsch H., Kuznetsova T. A., Ivanova E. P. & Elyakov G. B. (2005). Controlling production of brominated cyclic depsipeptides by *Pseudoalteromonas maricaloris* KMM 636^T. *Letters in Applied Microbiology* **40**(4): 243-248.
- Steinberg P., Schneider R. & Kjelleberg S. (1997). Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation* **8**(3): 211-220.
- Steinberg P. D. & De Nys R. (2002). Chemical mediation of colonisation of seaweed surface ¹ *Journal of Phycology* **38**(4): 621-629.
- Steindler L. & Venturi V. (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters* **266**(1): 1-9.
- Stevens A. M., Dolan K. M. & Greenberg E. P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(26): 12619-12623.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G. & Costerton J. W. (2002). Biofilm as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**(1): 187-209.
- Sturme M. H. J., Kleerebezem M., Nakayama J., Akkermans A. D. L., Vaughan E. E. & de Vos W. M. (2002). Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1-4) 233-243.

- Surette M. G., Miller M. B. & Bassler B. L. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(4): 1639-1644.
- Swift S., Karlyshev A. V., Fish L., Durant E. L., Winson M. K., Chhabra S. R., Williams P., Macintyre S. & Stewart G. S. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Journal of Bacteriology* **179**(17): 5271-5281.
- Swift S., Lynch M. J., Fish L., Kirke D. F., Tomás J. M., Stewart G. S. A. B. & Williams P. (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* **67**(10): 5192-5199.
- Tait K., Williamson H., Atkinson S., Williams P., Cámara M. & Joint I. (2009). Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signalling. *Environmental Microbiology* **11**(7): 1792-1802.
- Tan L. T. & Pi Lee Goh B. (2009). *Chemical ecology of marine cyanobacterial secondary metabolites: a mini-review*.
- Tateda K., Comte R., Pechere J.-C., Köhler T., Yamaguchi K. & Van Delden C. (2001). Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(6): 1930-1933.
- Taylor M. W., Schupp P. J., Baillie H. J., Charlton T. S., de Nys R., Kjelleberg S. & Steinberg P. D. (2004). Evidence for acyl Homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(7): 4387-4389.
- Teasdale M. E., Liu J., Wallace J., Akhlaghi F. & Rowley D. C. (2009). Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(3): 567-572.
- Teplitski M., Chen, H., Rajamani S., Gao M., Merighi M., Sayre R. T., Robinson J. B., Rolfe B. G. & Bauer W. D. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. *plant Physiology* **134**(1): 34-146.
- Terlizzi A., Frascchetti S., Gianguzza P., Faimali M. & Boero F. (2001). Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **11**(4): 311-317.
- Thomas K. V. (2001). The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: a review. *Biofouling* **17**(1): 73-86.
- Thomas K. V. & Brooks S. (2009). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* **26**(1): 73-88.

- Throup J. P., Camara M., Briggs G. S., Winson M. K., Chhabra S. R., Bycroft B. W., Williams P. & Stewart G. S. A. B. (1995). Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Molecular Microbiology* **17**(2): 345-356.
- Toté K., Berghe D. V., Maes L. & Cos P. (2008). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Letters in Applied Microbiology* **46**(2): 249-254.
- Trautner B. W. & Darouiche R. O. (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of Infection Control* **32**(3): 177-183.
- Travis J. (1993). Invader threatens black, azov seas. *Science* **262**(5138): 1366-1367.
- Tsoukatou M., Hellio C., Vagias C., Harvala C. & Roussis V. (2002). Chemical defense and antifouling activity of three mediterranean sponges of the Genus *Ircinia*. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung* **57c**: 161-171.
- Ulrich R. L., DeShazer D., Brueggemann E. E., Hines H. B., Oyston P. C. & Jeddelloh J. A. (2004). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Medical Microbiology* **53**(11): 1053-1064.
- Uroz S., Dessaux Y. & Oger P. (2009). Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *ChemBioChem* **10**(2): 205-216.
- van Alphen L. B., Burt S. A., Veenendaal A. K. J., Bleumink-Pluym N. M. C. & van Putten J. P. M. (2012). The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. *PLoS ONE* **7**(9): e45343.
- van Loosdrecht M. C., Lyklema J., Norde W. & Zehnder A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* **54**(1): 75-87.
- Vesterlund S., Paltta J., Karp M. & Ouwehand A. C. (2005). Measurement of bacterial adhesion—in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* **60**(2): 225-233.
- Visick K. L., Foster J., Doino J., McFall-Ngai M. & Ruby E. G. (2000). *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *Journal of Bacteriology* **182**(16): 4578-4586.
- von Bodman S. B., Majerczak D. R. & Coplin D. L. (1998). A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(13): 7687-7692.
- Voulvoulis N., Scrimshaw M. D. & Lester J. N. (1999). Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry* **13**(3): 135-143.
- Wagner-Döbler I., Thiel V., Eberl L., Allgaier M., Bodor A., Meyer S., Ebner S., Hennig A., Pukall R. & Schulz S (2005). Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *ChemBioChem* **6**(12): 2195-2206.

- Wang Y., Ikawa A., Okaue S., Taniguchi S., Osaka I., Yoshimoto A., Kishida Y., Arakawa R. & Enomoto K. (2008). Quorum sensing signaling molecules involved in the production of violacein by *Pseudoalteromonas*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**(7): 1958-1961.
- Wang H., Jiang P., Lu Y., Ruan Z., Jiang R., Xing X.-H., Lou K. & Wei D. (2009). Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. *Biochemical Engineering Journal* **44**(2-3): 119-124.
- Waters C. M. & Bassler B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**(1): 319-346.
- Watnick P. I. & Kolter R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* **34**(3): 586-595.
- Weeks J., Galindo C., Drake K., Adams G., Garner H. & Ficht T. (2010). *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiology* **10**(1): 167.
- West S. A., Diggle S. P., Buckling A., Gardner A. & Griffin A. S. (2007). The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**(1): 53-77.
- Whitehead N. A., Barnard A. M. L., Slater H., Simpson N. J. L. & Salmond G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**(4): 365-404.
- Whiteley M., Lee K. M. & Greenberg E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(24): 13904-13909.
- Wimpenny J., Manz W. & Szewzyk U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* **24**(5): 661-671.
- Winson M. K., Camara M., Latifi A., Foglino M., Chhabra S. R., Daykin M., Bally M., Chapon V., Salmond G. P. & Bycroft B. W. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(20): 9427-9431.
- Winson M. K., Swift S., Hill P. J., Sims C. M., Griesmayr G., Bycroft B. W., Williams P. & Stewart G. S. A. B. (1998). Engineering the luxCDABE genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiology Letters* **163**(2): 193-202.
- Withers H., Swift S. & Williams P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **4**(2): 186-193.
- Xavier J. B. & Foster K. R. (2007). Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(3): 876-881.

- Xu X.-W., Wu Y.-H., Wang C.-S., Gao X.-H., Wang X.-G. & Wu M. (2010). *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(9): 2176-2181.
- Yada S., Wang Y., Zou Y., Nagasaki K., Hosokawa K., Osaka I., Arakawa R. & Enomoto K. (2008). Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Marine Biotechnology* **10**(2): 128-132.
- Yang L. H., Xiong H., Lee O. O., Qi S. H. & Qian P. Y. (2007). Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in Applied Microbiology* **44**(6): 625-630.
- Yates E. A., Philipp B., Buckley C., Atkinson S., Chhabra S. R., Sockett R. E., Goldner M., Dessaux Y., Cámara M., Smith H. & Williams P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **70**(10): 5635-5646.
- Yebra D. M., Kiil S. & Dam-Johansen K. (2004). Antifouling- technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**(2): 75-104.
- Yoshida A., Ansai T., Takehara T. & Kuramitsu H. K. (2005). LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(5): 2372-2380.
- Zeng Z., Qian L., Cao L., Tan H., Huang Y., Xue X., Shen Y. & Zhou S. (2008). Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**(1): 119-126.
- Zhang L.-H. & Dong Y.-H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular Microbiology* **53**(6): 1563-1571.
- Zhu J., Beaber J. W., Moré M. I., Fuqua C., Eberhard A. & Winans S. C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **180**(20): 5398-5405.
- Zhu J. & Winans S. C. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(4): 1507-1512.
- Zhu J., Chai Y., Zhong Z., Li S. & Winans S. C. (2003). *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6949-6953.
- Zhu H. & Sun S. J. (2008). Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. *Current Microbiology* **57**(5): 418-422.

Zhu H., He C. C. & Chu Q. H. (2010). Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Letters in Applied Microbiology* **52**(3): 269-274.

Mise en évidence du système de communication quorum sensing impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée

Le contrôle du biofouling sur des surfaces inertes immergées ou en atmosphère humide est une nécessité dans le secteur marin, tant pour des raisons économiques qu'environnementales. La formation de biofilm microbien, étape préalable à la formation du biofouling, est souvent intrinsèquement liée chez les bactéries au système de communication "Quorum Sensing" (QS). Chez certaines bactéries Gram négatif, le QS est basé sur la perception de petites molécules diffusibles appelées *N*-Acyl Homosérine Lactones (AHLs). L'une des stratégies antifouling en voie de développement de nos jours repose sur l'inhibition du QS bactérien. L'objectif de cette thèse est d'utiliser certaines bactéries marines afin d'identifier des molécules anti-QS capables de perturber la formation de biofilm. Ce travail a donc porté sur la mise en évidence de molécules AHLs impliquées dans le QS chez certaines bactéries marines isolées de la rade de Toulon, l'étude de la modulation de certains phénotypes dont la formation du biofilm, par ces molécules et, la mise en place d'un test préliminaire d'inhibition du QS. Parmi les trois bactéries isolées de la rade de Toulon (TC8, TC14 et TC15) du genre *Pseudoalteromonas*, connues pour produire de nombreuses molécules actives, et testées pour leur capacité à sécréter des AHLs, seule *Pseudoalteromonas* sp. TC15 a produit la C₁₂-HSL. *P. ulvae* TC14, capable de produire un biofilm conséquent et de la violacéine, ne produit aucune AHL. Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser une bactérie marine comme outil de criblage anti-QS, interférant avec les AHLs et les conséquences sur son biofilm, des AHLs exogènes ont été testées sur la production de violacéine, la formation de biofilm et la mobilité de TC14. Certaines AHLs ont montré qu'elles pouvaient réguler la production de violacéine et la formation de biofilm chez TC14, suggérant l'existence d'un récepteur AHLs fonctionnel. Des tests préliminaires d'inhibition du QS ont été effectués avec des molécules commerciales et des analogues synthétiques. La 3-oxo-C₆-HSL commerciale, ainsi que l'esculetine et la *p*-benzoquinone, connues pour interférer avec le QS bactérien, ont été capables d'inhiber la production de violacéine ainsi que la formation de biofilm de TC14 à des concentrations n'affectant pas sa croissance. Cette étude suggère donc que *P. ulvae* TC14 pourrait être utilisée comme un outil de recherche de molécules anti-QS en conditions proches de celles trouvées dans l'environnement marin, et ce dans le but d'être ultérieurement testées sur la formation de biofilm. L'objectif à plus long terme reste de trouver un moyen de limiter la formation du biofilm en utilisant des molécules non toxiques pour l'environnement.

Mot clés : Inhibition du *quorum sensing*, AHLs, biofilm, bactéries marines, *Pseudoalteromonas*.

Evidence of an AHL-based communication system quorum sensing in marine bacteria isolated from the Mediterranean Sea

The biofouling control on immersed inert surfaces or in moist atmosphere is a necessity in the marine sector for both economic and environmental reasons. Microbial biofilm formation, the initial step of biofouling development, is intrinsically linked to the communication system "Quorum sensing" (QS). In some Gram negative bacteria, QS is based on the perception of small diffusible signaling molecules called Acyl Homoserine Lactones (AHLs). The inhibition of bacterial QS is part of the different antifouling strategies currently developed. This present work focused on the detection of AHLs molecules involved in this communication system in bacteria isolated from Toulon harbor and the study of modulation of some phenotypes, including biofilm formation, by these molecules as well as the development of a preliminary anti-QS assay. Three marine bacteria isolated from Toulon harbor (TC8, TC14 and TC15), belonging to the *Pseudoalteromonas* genus, known to synthesize many active molecules, have been tested for their ability to produce AHLs. Only *Pseudoalteromonas* sp. TC15 produced the C₁₂-HSL. *P. ulvae* TC14 a violacein-producing and biofilm-forming bacteria, did not secrete any AHLs. Few marine bacteria are used as an anti-QS screening tool, especially by interfering with AHLs with the goal of studying the consequences on biofilm formation. In order to evaluate the possibility to use TC14 with this purpose, exogenous AHLs were tested on the violacein production, the biofilm formation and the motility of TC14. Some AHLs were able to regulate violacein production and biofilm formation suggesting the presence of a functional AHLs receptor in TC14. Preliminary QS inhibition assays were performed with commercial molecules and synthetic analogues. The commercial 3-oxo-C₆-HSL as well as esculetin and *p*-benzoquinone, known to interfere with bacterial QS, were able to inhibit QS and biofilm formation at a non-toxic concentration. Overall, this study suggests that the marine strain *P. ulvae* TC14 may be used as a tool for the detection of anti-QS molecules in conditions closed to the marine environment. These molecules may subsequently be tested on the biofilm formation of marine bacteria. The long term objective is to find a way to limit biofilm formation, using non-toxic molecules for the environment.

Keywords: Quorum sensing inhibition, AHLs, biofilm, marine bacteria, *Pseudoalteromonas*.